

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Aneta Kalužíková

VZTAHY MEZI STRUKTUROU A RETENČNÍM CHOVÁNÍM  
DERIVÁTŮ SALICYLTHIOAMIDU

Quantitative Structure-Retention Relationships of  
Salicylthioamide Derivatives

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph. D.

Praha 2015

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 27. dubna 2015.

## Abstrakt

Cílem diplomové práce je studium vlivu substituentů na absorpční molekulová spektra derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu v ultrafialové oblasti, dále pak studium vztahů mezi strukturou studovaných látek a jejich retenčním chováním ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Všechny studované deriváty vykazují v ultrafialové oblasti dvě absorpční maxima při vlnových délkách přibližně 260 nm a 293 nm. Substituce auxochromním substituentem na acylovém kruhu vede k hyperchromnímu efektu zejména prvního absorpčního maxima a k bathochromnímu efektu. Přítomnost auxochromů na amidovém kruhu, s výjimkou nepolárních alifatických substituentů, vede rovněž k hyperchromnímu efektu. Dále byly pomocí HPLC chromatografie na koloně s obrácenou fází XDB-C18 ZORBAX v mobilní fázi acetonitril-voda s proměnlivým složením acetonitrilu naměřeny retenční časy studovaných derivátů. Byly nalezeny korelační rovnice mezi retenčním faktorem pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu, resp. směnicí závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi a rozdělovacím koeficientem oktanol-voda, resp. substituentovými konstantami hydrofobicity.

**Klíčová slova:** QSAR, HPLC, spektrometrie, benzylsalicylthioamidy

## Abstract

The aim of the thesis is to study the relationship between the structure of *N*-benzylsalicylthioamide derivatives and their retention behavior in high-pressure liquid chromatography. Furthermore, the influence of various substituents on electron absorption spectra in ultraviolet spectral range was studied. All studied derivatives have two absorption maxima in ultraviolet spectral range at 260 nm and 293 nm. The substitution of an auxochrome on the acyl ring leads to bathochromic shift and hyperchromic shift, especially of the first absorption maxima. The presence of an auxochrome on the amide ring leads to hyperchromic shift as well. HPLC reversed-phase chromatography, using XDB-C18 ZORBAX column and mobile phase with various composition of acetonitrile, was used to obtain retention times of the derivatives. Using this data, the correlation equations between retention factor (mobile phase with no acetonitrile), resp. slope of the dependence of the logarithm of retention factor on the volume fraction of acetonitrile in mobile phase, and partition coefficient octanol-water, resp. hydrophobic substituent constants, were derived.

**Key words:** QSAR, HPLC, spectrometry, benzylsalicylthioamides

## Poděkování

Děkuji RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za cenné rady, podněty a připomínky při zpracování diplomové práce.

## Obsah

<b>1</b>	<b>TEORETICKÝ ÚVOD</b>	<b>9</b>
1.1	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	9
1.2	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA VZTAHŮ MEZI STRUKTUROU A RETENČNÍM CHOVÁNÍM	10
1.2.1	FYZIKÁLNĚ CHEMICKÉ VLASTNOSTI MOLEKUL MAJÍCÍ VLIV NA JEJICH CHROMATOGRAFICKÉ CHOVÁNÍ	12
1.3	VLIV SUBSTITUENTŮ V MOLEKULOVÉ ABSORPČNÍ SPEKTROSKOPII V ULTRAFIALOVÉ OBLASTI	14
1.4	TUBERKULÓZA, ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÉ MYKOBAKTERIEMI	15
1.4.1	LÉČBA TUBERKULÓZY A ANTITUBERKULOTIKA	17
1.4.2	POTENCIÁLNÍ ANTITUBERKULOTIKA VE STRUKTURNÍ TŘÍDĚ SALICYLTHIOAMIDŮ	19
1.4.3	STUDOVANÉ DERIVÁTY SALICYLTHIOAMIDU	20
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>23</b>
2.1	STUDOVANÉ LÁTKY	23
2.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	24
2.3	POUŽITÉ METODY MĚŘENÍ A ZPRACOVÁNÍ DAT	24
2.3.1	MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTROMETRIE	24
2.3.2	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	24
2.3.3	QSRR, REGRESNÍ A STATISTICKÉ VÝPOČTY	25
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE</b>	<b>26</b>
3.1	STUDIUM VLIVU SUBSTITUENTŮ NA MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTRA DERIVÁTŮ <i>N</i> -BENZYLSALICYLTHIOAMIDU V ULTRAFIALOVÉ OBLASTI	26
3.2	STUDIUM VLIVU SUBSTITUENTŮ NA RETENČNÍ CHOVÁNÍ DERIVÁTŮ <i>N</i> -BENZYLSALICYLTHIOAMIDU	32
3.3	REGRESNÍ VZTAHY MEZI RETENČNÍMI FAKTORY A DESKRIPTORY STUDOVANÝCH LÁTEK	35
3.3.1	QSRR S ROZDĚLOVACÍM KOEFICIENTEM OKTANOL-VODA	39
3.3.2	QSRR S HYDROFOBNÍMI SUBSTITUENTOVÝMI $\pi$ KONSTANTAMI	42
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>48</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>51</b>

## Seznam použitých zkratk

$a$	směrnice kalibrační přímky
$A$	absorbance
$b$	úsek kalibrační přímky
$c$	molární koncentrace [mol dm <sup>-3</sup> ] nebo koeficient kalibrační přímky
$F$	hodnota F-testu
$F_{m, n, \alpha}$	tabelovaná kritická hodnota F-testu pro $n$ měření, $m$ stupňů volnosti a na hladině významnosti $\alpha$
$F_m$	průtoková rychlost mobilní fáze [ml min <sup>-1</sup> ]
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital
$k$	retenční faktor
$k_0$	retenční faktor pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu
$K_{o,w}$	rozdělovací koeficient oktanol-voda
$K_H$	rovnovážná rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu
$K_X$	rovnovážná rychlostní konstanta substituovaného derivátu
LUMO	nejnižší obsazený molekulový orbital
$M$	molární hmotnost [g mol <sup>-1</sup> ]
$n$	počet měření
$P$	rozdělovací koeficient oktanol-voda
$pK_a$	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny
QSAR	Quantitative Structure -(biological) Activity Relationships
QSRR	Quantitative Structure Retention Relationships
$r$	korelační koeficient
$S$	směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi
$s_y$	směrodatná odchylka lineární regrese
$t_M$	mrtvý retenční čas [s]
$t_R$	retenční čas analytu [s]
$w$	objemový zlomek

$\alpha$	hladina významnosti
$\varphi$	objemový zlomek acetonitrilu v mobilní fázi
$\lambda$	vlnová délka [nm]
$\pi$	substituentová konstanta hydrofobicity
$\sigma$	Hammettova substituentová konstanta

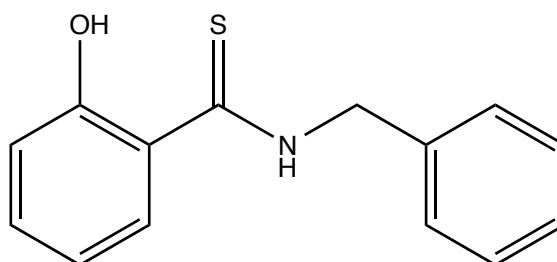


# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Cíl diplomové práce

Hlavním cílem předkládané diplomové práce je studium vlivu substituentů na absorpční molekulová spektra derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu (obr. 1.1) v ultrafialové oblasti, dále pak studium vztahů mezi strukturou studovaných látek a jejich retenčním chováním ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Ke studiu bylo vybráno dvacet pět derivátů, které se liší polohou a typem substituentu na obou aromatických kruzích; přehled všech studovaných látek je uveden v tabulce 2.1 (na str. 23).



**Obr. 1.1** Chemická struktura *N*-benzylsalicylthioamidu

## 1.2 Kvantitativní analýza vztahů mezi strukturou a retenčním chováním

Chemické a fyzikální vlastnosti chemických sloučenin jsou jednoznačně určeny strukturou jejich molekul. Jakoukoliv změnou v základním skeletu molekuly, např. změnou polohy a druhu substituentu, můžeme tyto vlastnosti ovlivňovat. Identifikací a kvantifikací chemicko-fyzikálních vlastností látek a následným vyhodnocením jejich vlivu na biologickou aktivitu, se zabývá vědní obor zvaný kvantitativní analýza vztahů mezi strukturou a (biologickou) aktivitou látek (QSAR, angl. Quantitative Structure-(biological) Activity Relationships). Jedním z podoborů této vědní disciplíny je kvantitativní analýza vztahů mezi strukturou a retenčním chováním látek (QSRR, angl. Quantitative Structure-Retention Relationships). První studie QSRR analýzy se datuje zpět do sedmdesátých let dvacátého století, kdy se postupně stala jedním z hlavních nástrojů tehdy se rychle rozvíjející chromatografie<sup>1,2</sup>. Průkopníkem QSRR analýzy se stal polský chemik Roman Kaliszan, který toto téma shrnul v několika svých publikacích<sup>3-6</sup>.

Výsledkem QSRR analýzy jsou statisticky odvozené matematické modely popisující vztahy mezi deskriptory, jež charakterizují molekulovou strukturu dané skupiny analytů a chromatografickými parametry. Pokud jsou odvozené vztahy statisticky významné a smysluplné, mohou být použity k predikci retence nově syntetizovaných analytů, k identifikaci strukturních deskriptorů s nejlepší schopností predikce retence, dále k získání poznatků o mechanismu separace daného chromatografického systému, k určení dalších fyzikálně-chemických vlastností jako je například lipofilita či disociační konstanty a v neposlední řadě také k predikci biologické aktivity skupiny příbuzných látek<sup>2</sup>.

Aby mohla být provedena statisticky významná QSRR analýza, je třeba získat retenční data dostatečně velké skupiny analytů, které mají stejnou základní strukturu a liší se pouze typem a polohou substituentů na aromatickém kruhu, či druhem heteroatomu. K tomuto účelu je hojně využívána metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie. První velkou výhodou této metody je schopnost produkce velkého množství relativně přesných a reprodukovatelných dat. Další výhodou je možnost analýzy za konstantních podmínek po celou dobu chromatografického procesu, čímž se

struktura analytu stává jedinou nezávisle proměnnou daného systému<sup>7</sup>.

Nejčastěji využívaným experimentálním parametrem popisujícím retenci v kapalinové chromatografii je retenční faktor  $k$ , resp. dekadický logaritmus retenčního faktoru  $\log k$ . Retenční faktor lze určit ze vztahu

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1.1)$$

kde  $k$  je retenční faktor,  $t_R$  je retenční čas analytu a  $t_M$  je mrtvý retenční čas.

Strukturu molekuly lze popsat pomocí molekulových strukturních deskriptorů. V dnešní době je k dispozici celá řada deskriptorů, které lze třídit podle druhu nesené informace na fyzikálně chemické, kvantově chemické a topologické. Hlavní výhodou fyzikálně chemických deskriptorů je přímá spojitost s retenčním chováním látek. Kvantově chemické deskriptory umožňují popis chromatografické retence na molekulární úrovni, avšak jejich odvození je složité a časově velmi náročné. Naopak topologické deskriptory jsou velmi lehce odvoditelné, jejich nevýhodou je však skutečnost, že nemusí být nutně v korelaci s retenčním chováním látek<sup>8</sup>. Seznam všech strukturních deskriptorů byl sepsán R. Todeschinim a V. Consonnim<sup>9</sup> (přehled vybraných strukturních deskriptorů v tab. 1.1).

**Tab. 1.1** Strukturní deskriptory běžně používané v QSRR analýze

<i>Deskriptory popisující velikost molekuly</i>	<i>Fyzikálně-chemické empirické a semiempirické parametry</i>
Uhlíkové číslo	Hammettova konstanta
Molekulová hmotnost	Hanschova konstanta
Refraktivita	Taftova sterická konstanta
Polarizovatelnost	Linear solvation energy relationship (LSER) parametry
Van der Waals objem a plocha	Rozdělovací koeficient
Celková energie	pK <sub>a</sub> hodnoty
	Teplota varu
<i>Deskriptory související s polaritou molekuly</i>	<i>Kombinované parametry popisující tvar a polaritu molekul</i>
Dipólový moment	Comparative molecular field analysis (CoMFA) parametry
HOMO a LUMO energie orbitalů	Comparative molecular surface analysis (CoMSA) parametry
<i>Molekulové deskriptory odvozené z grafů</i>	
Kappa indexy	
Topologické elektronové indexy	

### 1.2.1 Fyzikálně chemické vlastnosti molekul mající vliv na jejich chromatografické chování

V rámci QSRR analýzy se běžně studují hydrofobní, elektronové a sterické vlastnosti. Hydrofobní vlastnosti celých molekul či pouze substituentů lze snadno kvantifikovat. Naopak kvantifikace elektronových a sterických vlastností celých molekul je velmi složitá, proto se v tomto případě zaměřuje pouze na popis substituentů.

Hydrofobní charakter látky je důležitým parametrem, který určuje její chování v biologickém systému, tzn. jak snadno prochází buněčnou membránou či jakým způsobem interaguje s receptory. Změna substituentu na základním skeletu sloučeniny má významný efekt na její hydrofobicitu a tudíž také na její biologickou aktivitu. Hydrofobicitu lze vyjádřit pomocí rozdělovacího koeficientu oktanol-voda  $P$  (také  $K_{o,w}$ ) či pomocí substituentové konstanty hydrofobicity  $\pi$  (cit.<sup>10</sup>).

Rozdělovací koeficient  $n$ -oktanol-voda vyjadřuje celkovou hydrofobicitu látky a je mírou distribuce neutrální látky mezi dvě vzájemně nemísitelné kapalné fáze. Experimentálně určené hodnoty rozdělovacího koeficientu jsou charakteristické pro danou látku, v dané směsi dvou nemísitelných kapalin a za dané teploty. Matematicky je rozdělovací koeficient  $P$  definován jako poměr rovnovážných koncentrací látky v nevodné a vodné fázi

$$P = \frac{[X]_{n\text{-oktanol}}}{[X]_{\text{voda}}} \quad (1.2)$$

kde  $[X]_{n\text{-oktanol}}$  je rovnovážná koncentrace látky v  $n$ -oktanolu a  $[X]_{\text{voda}}$  je rovnovážná koncentrace látky ve vodě.

Čím je látka hydrofilnější, tím větší podíl látky přejde do oktanolu a menší do vody, z čehož vyplývá, že hydrofobní látky mají vysokou hodnotu  $P$ , zatímco hydrofilní látky mají hodnotu  $P$  nízkou. Vzhledem k řádově rozdílným číslům se v literatuře obvykle setkáváme s dekadickým logaritmem rozdělovacího koeficientu  $\log P$ . V současné době již existují matematické postupy, na základě kterých lze poměrně spolehlivě hodnotu rozdělovacího koeficientu odhadnout pouze ze znalosti molekulové struktury látky<sup>7</sup>.

Substituentová konstanta hydrofobicity  $\pi$  charakterizuje příspěvek daného substituentu k celkové hydrofobitě molekuly a je mírou toho, o kolik je daný substituent hydrofobnější v porovnání s nesubstituovaným derivátem (resp. derivátem, kde je substituentem vodík). Substituentová konstanta hydrofobicity  $\pi$  pro daný substituent je definována jako

$$\pi_X = \log P_X - \log P_H \quad (1.3)$$

kde  $P_X$  je rozdělovací koeficient oktanol-voda pro substituovaný derivát a  $P_H$  je rozdělovací koeficient oktanol-voda pro nesubstituovanou látku. Za standard s  $\pi = 0$  byl zvolen vodík. Kladná hodnota  $\pi$  vyjadřuje, že daný substituent má větší hydrofobní efekt než vodík. Záporných hodnot  $\pi$  pak nabývají substituenty, které jsou méně hydrofobní. Je nutno podotknout, že hodnoty konstant hydrofobicity aromatických substituentů se liší od hodnot konstant hydrofobicity alifatických substituentů<sup>11,12</sup>.

Tyto dva parametry mají význam v QSRR analýze, neboť byl pomocí metody HPLC na obrácených fázích nalezen lineární vztah

$$\text{retenční parametr} = a \log P + b \quad (1.4)$$

kde *retenční parametr* je buďto logaritmus retenčního faktoru  $\log k$  nebo logaritmus retenčního faktoru extrapolovaný na 100% vodu jako mobilní fázi  $\log k_0$ ,  $\log P$  je logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol-voda,  $a$  je směrnice a  $b$  úsek této lineární závislosti. V případě, že dochází pouze k záměně substituentů na základním skeletu sloučeniny v souboru studovaných látek, může být  $\log P$  nahrazen hodnotou  $\log \pi$ .

O tom jak snadno látka prostupuje biologickými membránami a jak silně interaguje s vazebným místem, rozhoduje také míra její ionizace či polarita<sup>10</sup>. Přímý vliv na ionizaci a polaritu látky mají elektronové efekty substituentů, které lze popsat pomocí Hammettovy substituentové konstanty  $\sigma$ . Tato konstanta pro daný substituent  $\sigma$  je vyjádřena vztahem

$$\sigma_X = \log K_X - \log K_H \quad (1.5)$$

kde  $K_X$  je rychlostní konstanta substituovaného derivátu a  $K_H$  je rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu. Kladné hodnoty  $\sigma$  přísluší elektrofilním substituentům, záporné hodnoty pak substituentům nukleofilním.

### 1.3 Vliv substituentů v molekulové absorpční spektroskopii v ultrafialové oblasti

Podstatou molekulové absorpční spektrometrie v ultrafialové oblasti je absorpce elektromagnetického záření v rozsahu vlnových délek 200–380 nm zředěnými roztoky molekul. Tato metoda se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek.

Při absorpci elektromagnetického záření v ultrafialové oblasti dochází k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Jedná se tedy ve své podstatě o elektronová spektra. Pokud se excitační energie pohybuje v rozmezí 200 – 600 kJ mol<sup>-1</sup>, může látka absorbovat v ultrafialové oblasti spektra. Absorpce UV záření je způsobena přechody vazebných elektronů z molekulových orbitalů  $\sigma$  či  $\pi$ , či elektronů nevazebných elektronových párů  $n$  do antivazebných molekulových orbitalů  $\sigma^*$  nebo  $\pi^*$ . U molekul, které obsahují násobné vazby nebo aromatické kruhy, dochází k elektronovému přechodu  $\pi\text{--}\pi^*$ . Patří sem například alkeny, alkyny, areny, aldehydy a ketony, karboxylové kyseliny, nitrosloučeniny a mnoho dalších. Skupiny atomů, jež umožňují při excitaci přechod  $\pi$  elektronů do antivazebných molekulových orbitalů  $\pi^*$ , se nazývají chromofory. S rostoucím počtem konjugovaných dvojných vazeb dochází v konjugovaných systémech k posunu absorpčního pásu přechodu  $\pi\text{--}\pi^*$  k vyšším vlnovým délkám. Podobný vliv mají také skupiny zvané auxochromy, které obsahují jeden nebo více volných elektronových párů ( $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-OH}$ ,  $\text{-SH}$  atd.). Tyto volné elektronové páry vstupují do konjugovaného systému a způsobují změnu vlnové délky a intensity absorpčního maxima. Elektrony nevazebných elektronových párů  $n$  na atomech vázaných násobnou vazbou mohou při absorpci záření přecházet do antivazebného molekulového orbitalu  $\pi^*$ . V porovnání s přechodem  $\pi\text{--}\pi^*$  je přechod  $n\text{--}\pi^*$  méně energeticky náročný a látky vykazují absorpční maximum při vyšších vlnových délkách<sup>13</sup>.

Posun absorpčního maxima k vyšším vlnovým délkám, ke kterému dochází buďto substitucí na chromoforu nebo změnou rozpouštědla, se nazývá bathochromní efekt. Například benzen absorbuje při vlnové délce maxima 256 nm, zatímco anilin při 280 nm, tento rozdíl vlnových délek o 24 nm je dán přítomností auxochromu  $\text{-NH}_2$ . Naopak posun absorpčního maxima k nižším vlnovým délkám se nazývá hypsochromní efekt a je způsoben snížením konjugace či změnou polarity rozpouštědla. Přítomnost

elektron-donorových či elektrofilních substituentů (auxochromů) v organických sloučeninách může vyvolat také snížení (hypochromní efekt) či naopak zvýšení (hyperchromní efekt) intenzity absorpce<sup>14</sup>.

Kvantifikací vlivu substituentů na molekulová absorpční spektra se zabýval například Valentič a kol.<sup>15</sup>. Předmětem jejich studie bylo hledání korelačních vztahů mezi absorpčními frekvencemi skupiny derivátů difenylpropanamidu a Hammettovými substituentovými konstantami. Podobnému studiu se věnoval také Gulseven Sidir a kol.<sup>16</sup>, který toto téma aplikoval na skupinu azo barviv.

## 1.4 Tuberkulóza, onemocnění způsobené mykobakteriemi

Tuberkulóza (TBC) je infekční onemocnění s vysokou morbiditou a mortalitou, které se řadí mezi specifické zánětlivé procesy vyvolané mykobakteriemi *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* a vzácně i *Mycobacterium africanum*.

*Mycobacterium tuberculosis* poprvé identifikoval v roce 1882 německý vědec Robert Koch. *M. tuberculosis* je nepohyblivá asi 1,5-5  $\mu\text{m}$  dlouhá tyčinková bakterie, rovná nebo zakřivená. Je aerobní, acidorezistentní a alkohol rezistentní. Buňky mykobakterií mají poměrně silnou buněčnou stěnu, složenou převážně z lipidů ve formě lipoproteinů a lipopolysacharidů. Právě tloušťka a složení buněčné stěny je hlavní příčinou neobvyklé odolnosti mykobakterií<sup>17</sup>.

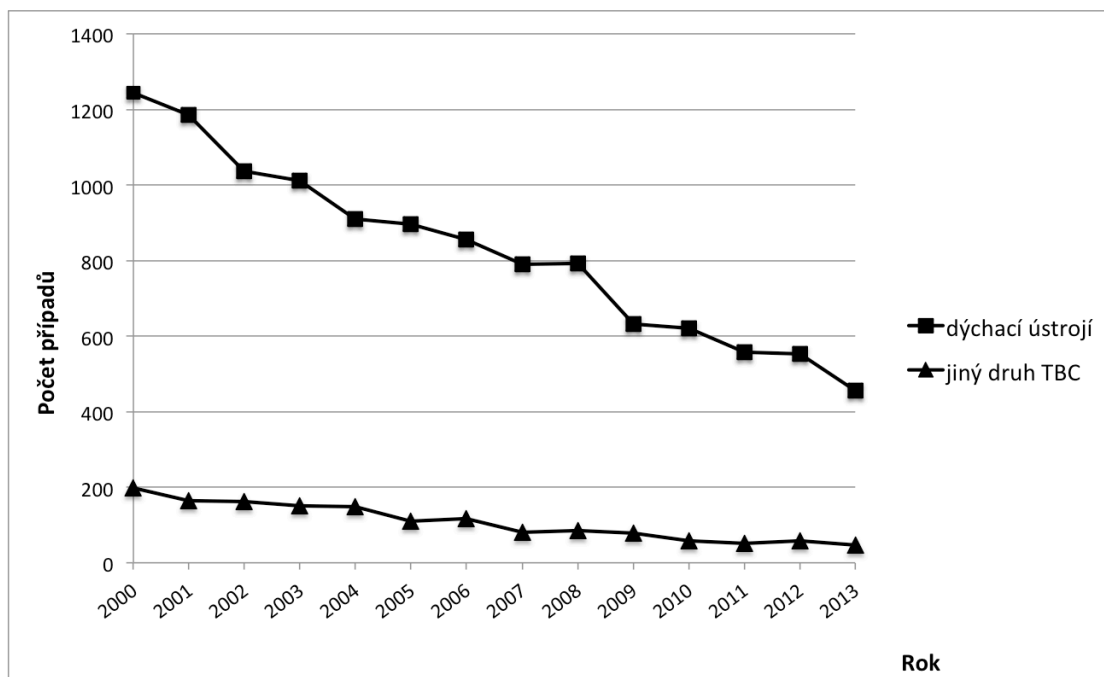
Tuberkulóza se přenáší kapénkovou infekcí, kdy je zdrojem člověk s nakažlivou formou onemocnění, nebo kontaktem s infikovaným materiálem (krev, moč, stolice, atd.). Mykobakterie vstupují do lidského organismu nejčastěji dýchacími cestami, o čemž svědčí vysoké procento onemocnění právě respiračního ústrojí (asi 85 %). Vzácně může dojít k tuberkulózní infekci při styku poraněné kůže s infekčním materiálem. Mykobakterie mohou být krevním či lymfatickým systémem zanášeny i do různých orgánů, kromě dýchacích cest mohou být tuberkulózou postiženy také například lymfatické uzliny, ledviny, nadledviny, střeva, kosti. Pravděpodobnost onemocnění po kontaktu s nakaženým člověkem klesá s časem, nákaza se však může projevit i po delším časovém odstupu, je-li imunitní systém člověka oslaben (HIV, nádor, pooperační doléčení a jiné)<sup>18</sup>.

Často se o tuberkulóze mluví jako o druhé celosvětově nejrozšířenější chorobě hned po onemocnění způsobeném virem HIV. Nejvíce postiženými oblastmi jsou země v jihovýchodní Asii, Africe a v subsaharské oblasti, tedy země rozvojové. V roce 2013 byl celosvětový počet nových případů tuberkulózy odhadnut na devět miliónů, což zhruba odpovídá 126 nakaženým osobám na 100 000 obyvatel. Asi padesát šest procent z celosvětové incidence je přiřazováno oblastem severovýchodní Asie a zemím západního Tichomoří a zhruba dvacet devět procent africkým zemím. V důsledku očkování a zlepšení životních podmínek se počet onemocnění tuberkulózou postupně pomalu snižuje, průměrně o 1,5 % v období mezi lety 2000 a 2013, mezi lety 2012 a 2013 je to pak pokles v průměru o 0,6 %. Nejvyšší pravděpodobnost podlehnutí tuberkulóze mají nemocní s HIV/AIDS, další vliv mohou mít nadměrná konzumace alkoholu a kouření cigaret<sup>18,19</sup>.

V České republice<sup>20</sup> bylo v roce 2013 podle Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR evidováno 502 případů tuberkulózy, tj. 4,8 případu na 100 000 obyvatel. V totéž roce bylo nahlášeno do Registru TBC 44 úmrtí způsobených tímto onemocněním, z toho 42 osob bylo dříve léčeno proti tuberkulóze. Obecně lze říci, že i na území České republiky počet nemocných klesá (obr. 1.2).

Příčina pandemie tuberkulózy pramení jednak v mechanismu působení *Mycobacterium tuberculosis*. Dalšími důvody pak mohou být odpor pacientů k léčbě, nedostupnost dostatečné lékařské pomoci či nedodržení správného léčebného programu. Velkým nebezpečím, především díky přemnožení *Mycobacterium tuberculosis* v populaci a nedůsledné léčbě antituberkulotiky, se staly nově vzniklé multi nebo rozsáhle rezistentní mutanty *Mycobacterium tuberculosis*. Dalším problémem v řešení tuberkulózy jsou tzv. „atypické“ nebo „podmíněně patogenní“ mykobakteriální kmeny (např. *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*). Tyto mykobakterie jsou v přírodě hojně rozšířené, vyskytují se na rostlinách, v půdě, v odpadních vodách i ve vzduchu. Onemocnění (mykobakteriáza), které tyto bakterie způsobují, se svým průběhem podobá tuberkulóze, většinou však v tomto případě nepomáhá léčba běžnými antituberkulotiky. Postiženy bývají hlavně plíce, kůže, mízní uzliny, kosti<sup>21</sup>.





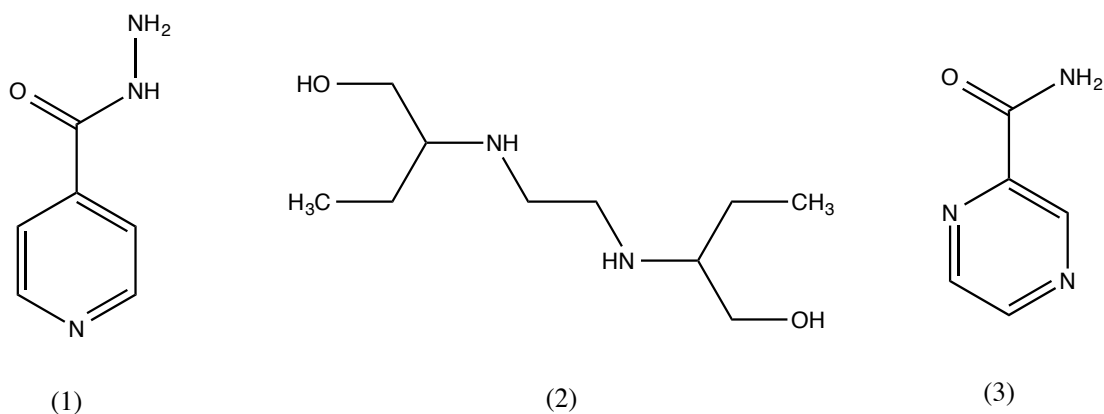
**Obr. 1.2** Vývoj incidence tuberkulózy v České republice v letech 2000 až 2013 (hodnoty získány z Registru TBC<sup>20</sup>).

#### 1.4.1 Léčba tuberkulózy a antituberkulotika

Cílené hledání možných účinných látek proti tuberkulóze se začalo rozvíjet až v roce 1882, kdy byl odhalen původce onemocnění. První pokusy, kdy byly nemocným podávána různá barviva, silice a antiseptika, vedly k neúspěchu, neboť ani jedna z aplikovaných látek nebyla účinná. Další pokusy probíhaly s použitím různých sloučenin těžkých kovů, např. mědi, rtuti a hlavně zlata. I v tomto případě se lékaři dočkali neúspěchu. Ukázalo se, že sloučeniny zlata sice působí blahodárně na imunitní systém nemocného, ale nepůsobí proti původci onemocnění a navíc jsou značně toxické. V minulosti se mimo medikaci prováděly také chirurgické zákroky, zejména pneumotorax postižené plíce, ve výjimečných případech i resekce plic<sup>22</sup>.

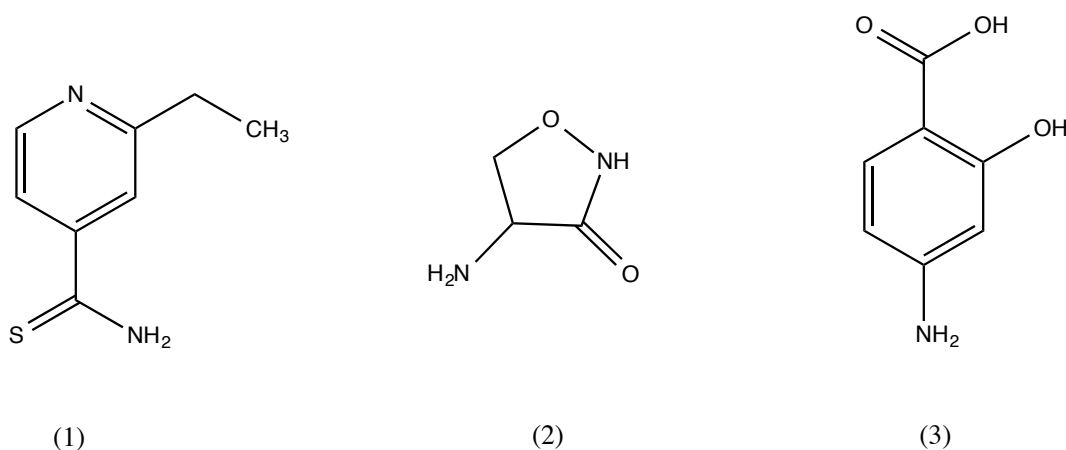
V dnešní době<sup>23</sup> je k inhibici růstu a množení mykobakterií používána pestrá škála chemoterapeutik a antibiotik. Léčiva používaná k léčbě tuberkulózy se souborně nazývají antituberkulotika nebo tuberkulostatika.

Antituberkulotika se většinou dělí do dvou řad. První řadu tvoří vysoce účinné látky s nízkou toxicitou, mezi které se řadí chemoterapeutika isoniazid, ethambutol a pyrazinamid a antibiotika rifampicin a streptomycin.



**Obr. 1.3** Chemická struktura vybraných látek první řady antituberkulotik; isoniazid (1), ethambutol (2) a pyrazinamid (3)

Druhá řada se vyznačuje nižší účinností a vyšší toxicitou, ale látky působí i na rezistentní kmeny. Do této skupiny antituberkulotik patří ethionamid, cykloserin, *p*-aminosalicylová kyselina a také antibiotika kapreomycin a viomycin.



**Obr. 1.4** Chemická struktura vybraných látek druhé třídy antituberkulotik; ethionamid (1), cykloserin (2), kyselina *p*-aminosalicylová (3)

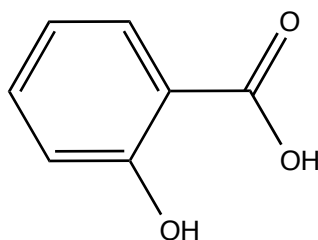
Při léčbě tuberkulózy se nejprve podávají léčiva první řady. V případě, že jsou tyto látky nedostatečně účinné, přistoupí se k podání léčiv z druhé řady antituberkulotik, která ovšem mají vyšší toxicitu. Vzhledem k tomu, že léčba tuberkulózy je zdlouhavá (trvá měsíce), hrozí zde vznik rezistence původce onemocnění na podávaná léčiva. Aby se rozvoji rezistence předešlo, je třeba v souladu s RTG nálezy zvolit vhodnou kombinaci antituberkulotik a zajistit jejich správné užívání.

Pro léčbu tuberkulózy a její odlišná stádia bylo vypracováno mnoho postupů terapie. Na počátku (dva měsíce) je zpravidla léčba zahájena podáváním kombinací tří nebo čtyř látek z první skupiny antituberkulotik. Poté se v další fázi (sedm až deset měsíců) pokračuje už jen s dvojkombinací antituberkulotik základní řady<sup>24,25</sup>.

Ze znalosti struktury, fyzikálně chemických vlastností a biologické aktivity již známých a účinných látek se vychází při vývoji nových léčiv. V případě antituberkulotik je známo již několik předlohových struktur, ze kterých se dá při výzkumu vycházet. Nová, potenciální léčiva se získávají pozměňováním těchto výchozích předlohových struktur, s cílem zvýšit účinnost léčiva zásahem do jeho farmakokinetických a farmakodynamických vlastností, či odstranit některý z jeho nedostatků (např. vedlejší účinky, nestabilitu, chuť a jiné). Mnohdy se však hledají léčiva se zcela odlišnou strukturou, neboť u látek odvozených ze stejné předlohové struktury může dojít ke vzniku zkřížené resistance a tedy ztrátě účinnosti.

#### 1.4.2 Potenciální antituberkulotika ve strukturní třídě salicylthioamidů

Látky odvozené od kyseliny salicylové (obr. 1.5) hrají ve studiu antituberkulotik a antimykotik významnou roli. Některé z nich, například kyselina *p*-aminosalicylová, se v praxi běžně užívají. Doposud byly připraveny a analyzovány stovky derivátů kyseliny salicylové. Z počátku byla věnována pozornost salicylanilidům a jejich modifikacím jak na acylové, tak i na aminové části molekuly. QSAR analýzou se ukázalo, že antimykobakteriální aktivitu pozitivně ovlivňují elektron-akceptorové a lipofilní substituenty v aminové části molekuly. Vliv substituentů v acylové části molekuly se ukázal být statisticky významný, avšak obtížně interpretovatelný. Ukázalo se, že salicylanilidy dosahují stejné úrovně antimykobakteriální aktivity jako antituberkulotika první řady. Myslelo se, že obsahují farmakofor jehož optimalizací by bylo možné získat látky ještě účinnější. Proto byly následně syntetizovány další strukturní analogy, u nichž byla blíže zkoumána biologická aktivita, tyto studie však nevedly k účinnějším látkám<sup>26,27</sup>.



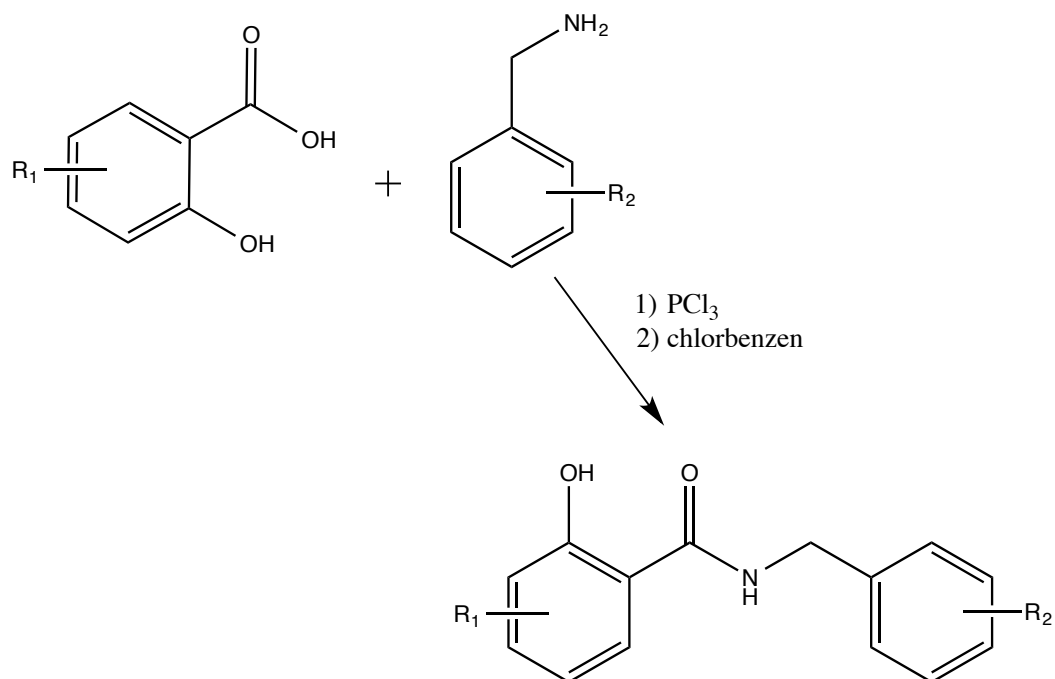
**Obr. 1. 5** Chemická struktura kyseliny salicylové

Další výzkum salicylamidů vedl ke studiu isosterních derivátů. Nahrazení karbonylu za thiokarbonyl vedlo ke vzniku salicylthioamidů, u nichž lze předpokládat určitou podobnost se salicylamidy ve fyzikálně-chemických vlastnostech a biologické aktivitě. Prokázalo se, že náhrada kyslíkového atomu sírou vede ke zvýšení antimykobakteriální aktivity. Salicylthioamidy se tak staly podnětem pro další výzkum a syntézu nových derivátů. Této tématice se důkladně věnovala skupina profesora Waissera na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy<sup>28,29</sup>.

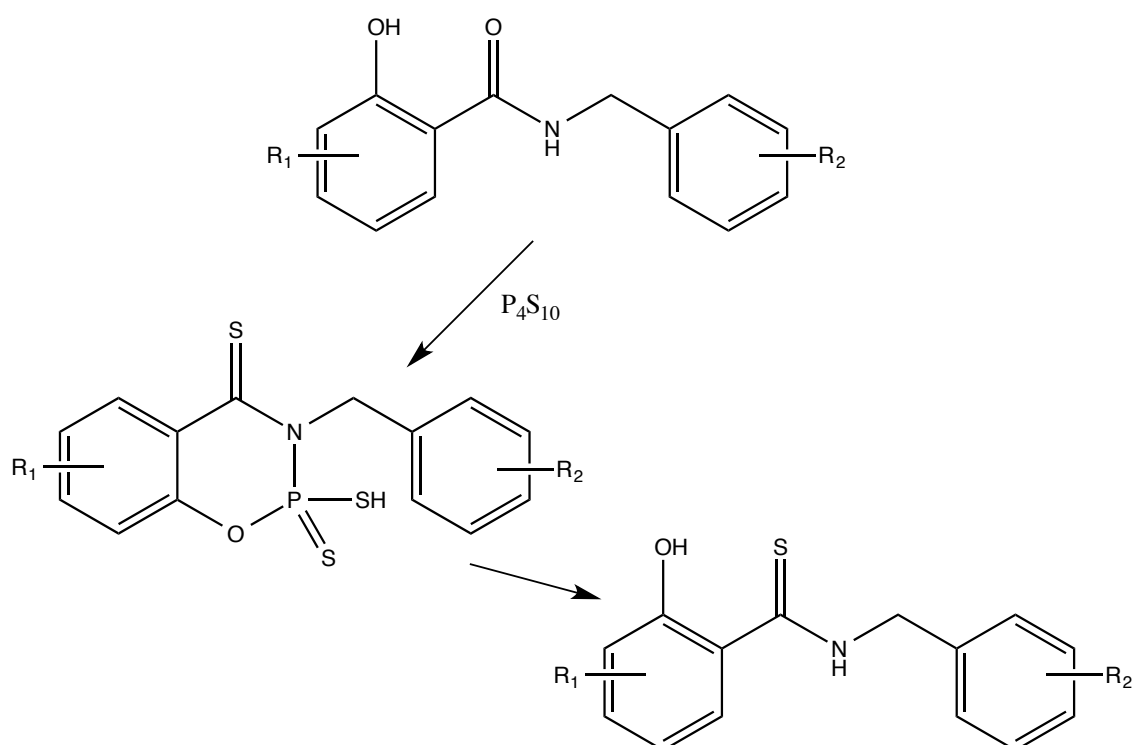
#### 1.4.3 Studované deriváty salicylthioamidu

Předkládaná práce studuje dvacet pět nově syntetizovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu. Deriváty se od sebe navzájem liší typem a polohou substituentu na obou aromatických kruzích. Přehled všech studovaných látek je uveden v tabulce 2.1 (na str. 23)

Příprava substituovaných *N*-benzylsalicylthioamidů probíhá ve třech krocích. Výchozí sloučeninou syntézy je *N*-benzylsalicylamid, který vzniká reakcí derivátu benzylaminu s  $\text{PCl}_3$ -aktivovanou substituovanou kyselinou salicylovou v prostředí chlorbenzenu<sup>27</sup> podle rovnice



V dalším kroku dochází k mikrovlnné thionaci vzniklých *N*-benzylsalicylamidů, které reagují s  $\text{P}_4\text{S}_{10}$  za vzniku heterocyklických sloučenin, jejichž následnou hydrolýzou vznikají příslušné *N*-benzylsalicylthioamidy

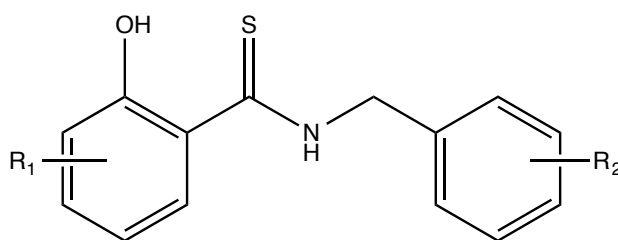


U studovaných látek byla prokázána *in-vitro* antimykobakteriální aktivita<sup>29</sup> proti *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. kansasii* CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* CNCTC My 330/88 a *M. kansasii* 6509/96. Ve všech případech se antimykobakteriální aktivita ukázala být srovnatelná či vyšší než aktivita běžně používaného isoniazidu. Hodnoty minimální inhibiční koncentrace souboru studovaných látek byly určeny po čtrnáctidenní a dvaceti jedna denní inkubaci při 37 °C a pohybovaly se v rozmezí od 0,125 µmol/L do 125 µmol/L. Souhrnný přehled minimálních inhibičních koncentrací studovaných derivátů v porovnání s hodnotami isoniazidu uvádí ve své práci Doležal a kol<sup>30</sup>. Deriváty **4** *N*-(4-methylbenzyl)-2-hydroxythiobenzamid a **20** *N*-(4-methylbenzyl)-2-hydroxy-4-methylthiobenzamid ve srovnání s ostatními deriváty vykazují největší inhibiční aktivitu proti všem testovaným mykobakteriálním kmenům. Obecně lze říci, že antimykobakteriální aktivita *N*-benzylsalicylthioamidu se zvyšuje v přítomnosti elektron-donorových a lipofilních substituentů v acylové části molekuly.

## 2 Experimentální část

### 2.1 Studované látky

Studované deriváty *N*-benzylsalicylthioamidu byly syntetizovány na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Totožnost a čistota byly stanoveny elementární analýzou, měřením bodu tání a nukleární magnetickou rezonancí. Přehled studovaných látek je uveden v tab. 2.1.



**Tab. 2.1** Struktury a molární hmotnosti studovaných *N*-benzylsalicylthioamidů

derivát	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	M
	substituent	substituent	g mol <sup>-1</sup>
<b>1</b>	-H	-H	243,33
<b>2</b>	-H	3-CH <sub>3</sub>	257,35
<b>3</b>	-H	3-Cl	277,77
<b>4</b>	-H	4-CH <sub>3</sub>	257,36
<b>5</b>	-H	4-Cl	277,77
<b>6</b>	-H	4-F	261,31
<b>7</b>	-H	4-OCH <sub>3</sub>	273,36
<b>8</b>	-H	4- <i>terc</i> -butyl	299,43
<b>9</b>	-H	3,4-Cl <sub>2</sub>	312,22
<b>10</b>	4-OCH <sub>3</sub>	-H	273,35
<b>11</b>	5-Cl	-H	277,77
<b>12</b>	4-CH <sub>3</sub>	-H	257,35
<b>13</b>	5-Br	3-Br	401,12

derivát	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	M
	substituent	substituent	g mol <sup>-1</sup>
<b>14</b>	4-OCH <sub>3</sub>	3-Cl	307,80
<b>15</b>	4-CH <sub>3</sub>	3-NO <sub>2</sub>	302,35
<b>16</b>	4-Cl	4-Br	356,67
<b>17</b>	5-Br	4-Br	401,12
<b>18</b>	3-CH <sub>3</sub>	4-Cl	291,80
<b>19</b>	5-Cl	4-F	295,76
<b>20</b>	4-CH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub>	271,38
<b>21</b>	5-NO <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub>	302,35
<b>22</b>	5-Cl	3,4-Cl <sub>2</sub>	346,66
<b>23</b>	5-Br	3,4-Cl <sub>2</sub>	391,11
<b>24</b>	4-CH <sub>3</sub>	4- <i>terc</i> -butyl	313,46
<b>25</b>	5-OCH <sub>3</sub>	-H	273,35

## 2.2 Použité chemikálie

Jako prostředí pro chromatografická a spektrofotometrická měření byl použit acetonitril HPLC čistoty Chromasolv (Sigma-Aldrich) s obsahem vody nižším než 0,02 obj. %. Pro stanovení mrtvého retenčního času byl použit methanol LC-MS čistoty Ultra Chromasolv (Sigma-Aldrich). Pro přípravu mobilní fáze byla používána deionizovaná voda připravená pomocí Mili-Q Water Purification Systemu (Millipore, USA).

## 2.3 Použité metody měření a zpracování dat

### 2.3.1 Molekulová absorpční spektrometrie

Spektrofotometrická měření studovaných látek byla prováděna na jednopaprskovém spektrofotometru HP 8453 s diodovým polem (Hewlett Packard) v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm. Finální roztoky o koncentraci  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , které byly použity pro spektrofotometrickou analýzu, byly připraveny dvoustupňovým ředěním acetonitrilem, aby se předešlo náhodným chybám. Jako blank byl použit čistý roztok acetonitrilu. Spektra byla proměřena v rozsahu vlnových délek 200–400 nm.

### 2.3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

K získání retenčních časů derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf LC-10AD VP Shimadzu se spektrofotometrickou UV-VIS detekcí (SPD-10A VP Shimadzu detektor). Pro analýzu na obrácených fázích byla zvolena kolona XDB-C18 ZORBAX® o délce 250 mm, průměru 4,6 mm a velikosti částic 5  $\mu\text{m}$ . Průtok mobilní fáze byl nastaven na  $0,8 \text{ ml min}^{-1}$  a dávkovaný objem vzorku byl 10  $\mu\text{l}$ . Absorbance byla měřena při vlnové délce maxima 265 nm.



Vzorky o koncentraci  $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ , které byly použity pro chromatografickou analýzu, byly připraveny naředěním zásobních roztoků ( $1 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) acetonitrilem. Pro stanovení mrtvého času byl použit roztok methanolu.

Mobilní fázi byla směs acetonitrilu a vody s proměnlivým složením acetonitrilu  $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80; 0,75; 0,70; 0,65$  a  $0,60$ . Získané chromatogramy byly vyhodnoceny v programu Class-VP Shimadzu. Retenční faktor  $k$  byl získán ze vztahu (1.1).

### 2.3.3 QSRR, Regresní a statistické výpočty

Všechna naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy na hladině významnosti 0,95 (cit.<sup>31,32</sup>). Výsledky spektrofotometrického a chromatografického měření studovaných látek jsou prezentovány jako mediány vždy ze tří paralelních měření. K získání lineární závislosti dvou proměnných byla použita metoda lineární regrese s vyhodnocením příslušných odchylek a korelačních koeficientů. Všechny regresní a statistické výpočty byly realizovány pomocí softwarového programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Ke tvorbě grafů byl použit softwarový program Microcal Origin 6.0 (OriginLab Corporation, USA).

Hodnoty rozdělovacích koeficientů oktanol-voda pro jednotlivé studované deriváty *N*-benzylsalicylthioamidu byly vypočítány pomocí programu ChemDraw 14.0 (PerkinElmer, USA).

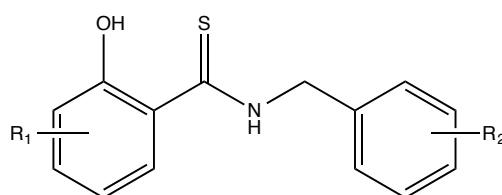
Substituentové konstanty hydrofobicity  $\pi$  byly převzaty z tabulek Hansche, Lea a Hoekmana<sup>33</sup>. U studovaných derivátů s více substituenty v molekule byly substituentové konstanty získány součtem substituentových konstant jednotlivých substituentů.

### 3 Výsledky a diskuze

#### 3.1 Studium vlivu substituentů na molekulová absorpční spektra derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu v ultrafialové oblasti

Byla změřena UV molekulová absorpční spektra studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu a vyhodnocena příslušná absorpční maxima. Hodnoty absorpčních maxim jsou uvedeny v tabulce 3.1.

**Tab. 3.1** Struktury a vlnové délky absorpčních maxim studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu



derivát	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\max}$
	substituent	substituent	nm	nm
<b>1</b>	-H	-H	260	293
<b>2</b>	-H	3-CH <sub>3</sub>	260	294
<b>3</b>	-H	3-Cl	261	293
<b>4</b>	-H	4-CH <sub>3</sub>	260	293
<b>5</b>	-H	4-Cl	261	293
<b>6</b>	-H	4-F	261	293
<b>7</b>	-H	4-OCH <sub>3</sub>	262	291
<b>8</b>	-H	4- <i>terc</i> -butyl	261	294
<b>9</b>	-H	3,4-Cl <sub>2</sub>	260	293
<b>10</b>	4-OCH <sub>3</sub>	-H	279	321
<b>11</b>	5-Cl	-H	258	297
<b>12</b>	4-CH <sub>3</sub>	-H	268	291
<b>13</b>	5-Br	3-Br	258	296

derivát	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$\lambda_{\max}$	$\lambda_{\max}$
	substituent	substituent	nm	nm
<b>14</b>	4-OCH <sub>3</sub>	3-Cl	278	322
<b>15</b>	4-CH <sub>3</sub>	3-NO <sub>2</sub>	268	326
<b>16</b>	4-Cl	4-Br	265	297
<b>17</b>	5-Br	4-Br	256	297
<b>18</b>	3-CH <sub>3</sub>	4-Cl	269	291
<b>19</b>	5-Cl	4-F	259	296
<b>20</b>	3-CH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub>	269	292
<b>21</b>	5-NO <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub>	254	294
<b>22</b>	5-Cl	3,4-Cl <sub>2</sub>	257	296
<b>23</b>	5-Br	3,4-Cl <sub>2</sub>	257	296
<b>24</b>	4-CH <sub>3</sub>	4- <i>terc</i> -butyl	269	294
<b>25</b>	5-OCH <sub>3</sub>	3-NO <sub>2</sub>	266	294

Byla sestrojena kalibrační závislost absorbance na koncentraci derivátu **1**, aby se prokázalo, že se molekulová absorpční spektra studovaných látek nemění v závislosti na jejich koncentraci (obr. 3.1).

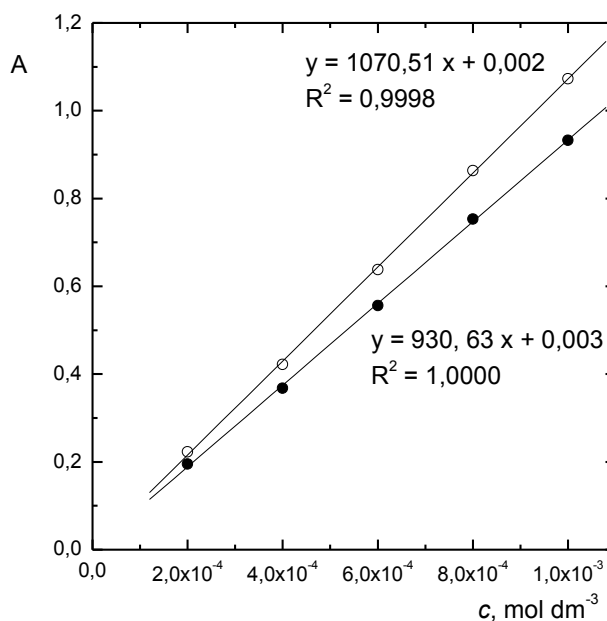
Ze spekter bylo zjištěno, že všechny studované deriváty vykazují v ultrafialové oblasti dvě absorpční maxima při vlnových délkách okolo 260 nm a 293 nm. Jednoduché amidy absorbují UV záření při vlnové délce maxima přibližně 200 nm. Záměna atomu kyslíku za atom síry v amidech vede k posunu absorpčního pásu přechodu  $\pi-\pi^*$  k vyšším vlnovým délkám, asi 260 nm. První absorpční maximum lze tedy ztotožnit s  $\pi-\pi^*$  přechodem konjugovaného systému, který je tvořen aromatickým kruhem a amidovou funkční skupinou<sup>34</sup>.

Vliv substituentů na molekulová absorpční spektra v ultrafialové oblasti bylo možno charakterizovat pouze kvalitativně, protože se v molekulách studovaných látek vyskytují dvě strukturní obměny (substituce na aromatickém kruhu v acylové části molekuly a substituce na aromatickém kruhu v amidové části molekuly), které by se mohly navzájem ovlivňovat.

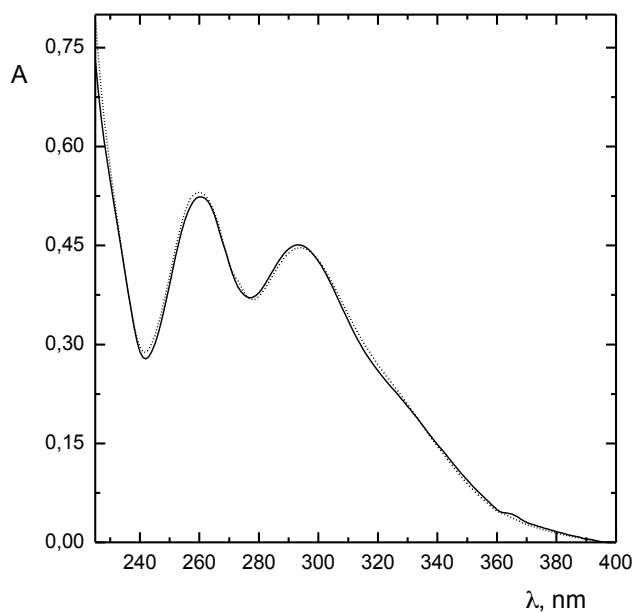
Základní derivát **1**, nesubstituovaný *N*-benzylsalicylthioamid, vykazuje dvě absorpční maxima při 260 nm a 293 nm. Záměna jednoho atomu vodíku na aromatickém kruhu v amidové části molekuly za methylovou skupinu nevede k žádné změně spektra (obr. 3.2). Obecně však platí, že přítomnost auxochromního substituentu (např.  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{X}$ ) vede k hyperchromnímu efektu, který se projevuje zvýšením intenzity absorpce. Záměna jednoho atomu vodíku na aromatickém kruhu v amidové části molekuly za methoxy skupinu vede k mírnému hyperchromnímu efektu a ke zjemnění struktury spektra mezi prvním a druhým absorpčním maximem (obr. 3.3). V případě substituce dvěma atomy chloru za dva atomy vodíku dochází ke zvýšení hodnot molárních absorpčních koeficientů obou absorpčních maxim (obr. 3.4). Bathochromní efekt, který je pro auxochromní substituenty také charakteristický, nebyl u takto substituovaných derivátů pozorován.

Záměna atomu vodíku na aromatickém kruhu v acylové části molekuly za auxochromní substituent (obr. 3.5, methylová, methoxy skupina) vede ke zvýšení hodnoty molárního absorpčního koeficientu zejména prvního absorpčního maxima a zároveň vede k posunu absorpčního pásu k vyšším vlnovým délkám. Substituce nitroskupinou se rovněž projevuje hyperchromním a bathochromním efektem (obr. 3.6.).

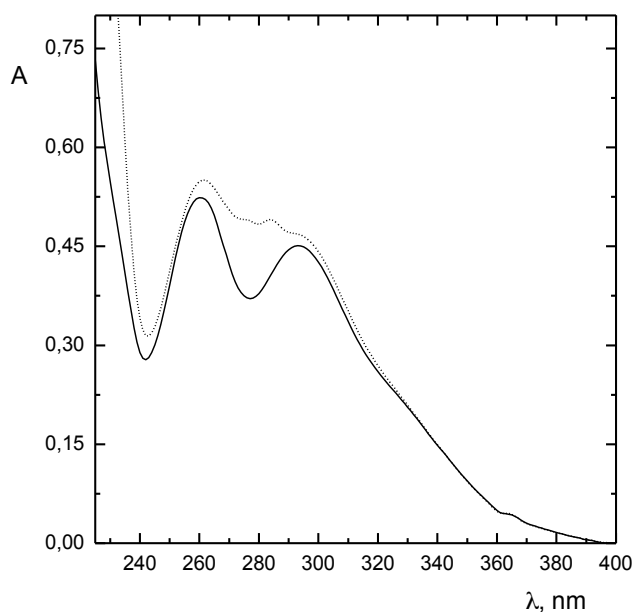
Uvedený obr. 3.7 potvrzuje skutečnost, že substituce v amidové části molekuly nepolární alifatickou skupinou nevede ke změně spektra. Naopak záměna atomu vodíku za nepolární alifatickou skupinu v acylové části molekuly se projevuje znatelným zvýšením intenzity absorpce.



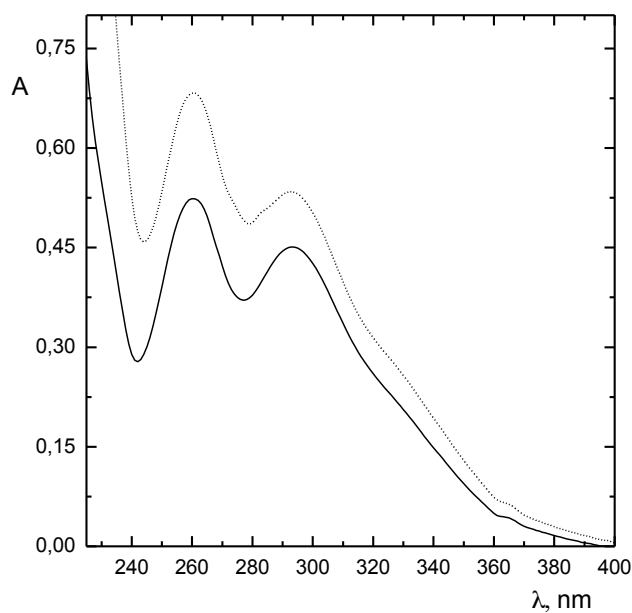
**Obr. 3.1** Kalibrační závislost absorpce na koncentraci *N*-benzyl-2-hydroxy-thiobenzamidu (derivát **1**), kde (•) představuje kalibrační závislost absorpce prvního absorpčního maxima (λ<sub>max</sub> = 260 nm) na koncentraci derivátu **1** a (o) představuje kalibrační závislost absorpce druhého absorpčního maxima (λ<sub>max</sub> = 293 nm) na koncentraci derivátu **1**.



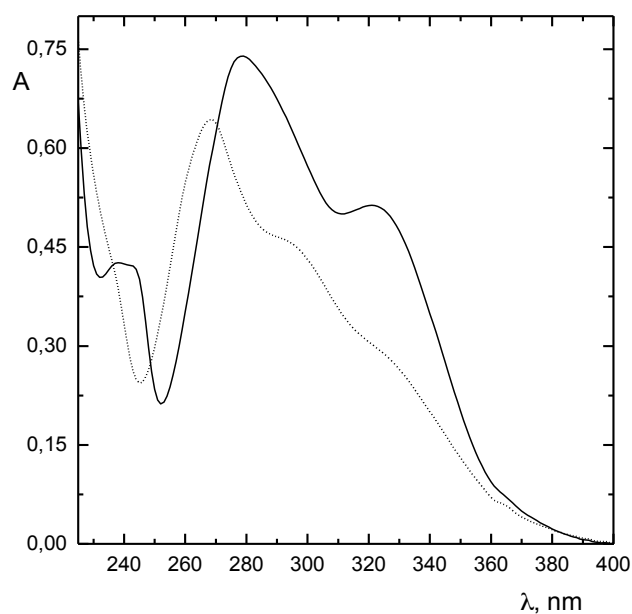
**Obr. 3.2** Vliv druhu substituentu na aromatickém kruhu v amidové části molekuly na UV absorpční spektra studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ ): plná čára: *N*-benzyl-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **1**), tečkovaná čára: *N*-(3-methylbenzyl)-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **2**).



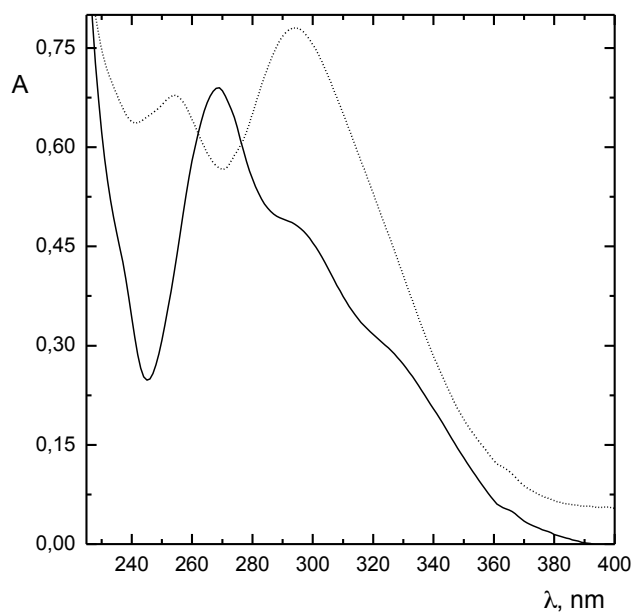
**Obr. 3.3** Vliv druhu substituentu na aromatickém kruhu v amidové části molekuly na UV absorpční spektra studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ ): plná čára: *N*-benzyl-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **1**), tečkovaná čára: *N*-(4-methoxybenzyl)-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **7**).



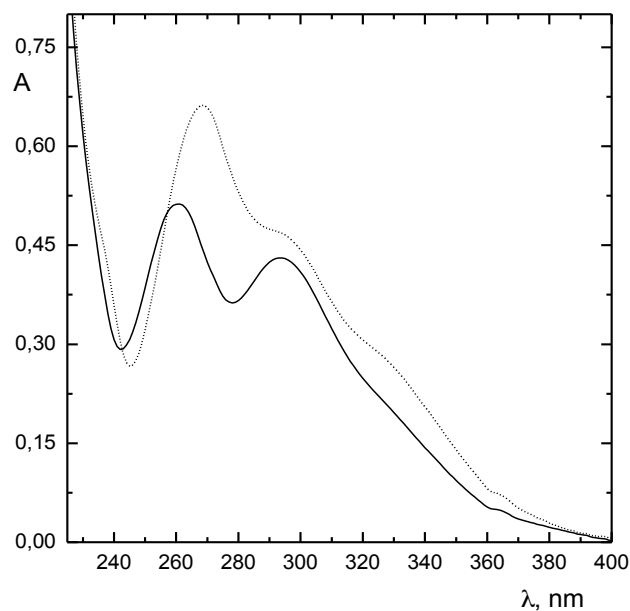
**Obr. 3.4** Vliv druhu substituentu na aromatickém kruhu v amidové části molekuly na UV absorpční spektra studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ ): plná čára: *N*-benzyl-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **1**), tečkovaná čára: *N*-(3,4-dichlorbenzyl)-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **9**).



**Obr. 3.5** Vliv druhu substituentu na aromatickém kruhu v acylové části molekuly na UV absorpční spektra studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ ): plná čára: *N*-benzyl-2-hydroxy-4-methoxy-thiobenzamid (derivát **10**), tečkovaná čára: *N*-benzyl-2-hydroxy-4-methyl-thiobenzamid (derivát **12**).



**Obr. 3.6** Vliv druhu substituentu na aromatickém kruhu v acylové části molekuly na UV absorpční spektra studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ ): plná čára: *N*-(4-methylbenzyl)-2-hydroxy-4-methyl-thiobenzamid (derivát **20**), tečkovaná čára: *N*-(4-methylbenzyl)-2-hydroxy-5-nitro-thiobenzamid (derivát **21**).



**Obr. 3.7** UV absorpční spektrum derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu ( $c = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ ): plná čára: *N*-(4-*tert*-butylbenzyl)-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **8**), tečkovaná čára: *N*-(4-*tert*-butylbenzyl)-2-hydroxy-4-methyl-thiobenzamid (derivát **24**).

### 3.2 Studium vlivu substituentů na retenční chování derivátů

#### *N*-benzylsalicylthioamidu

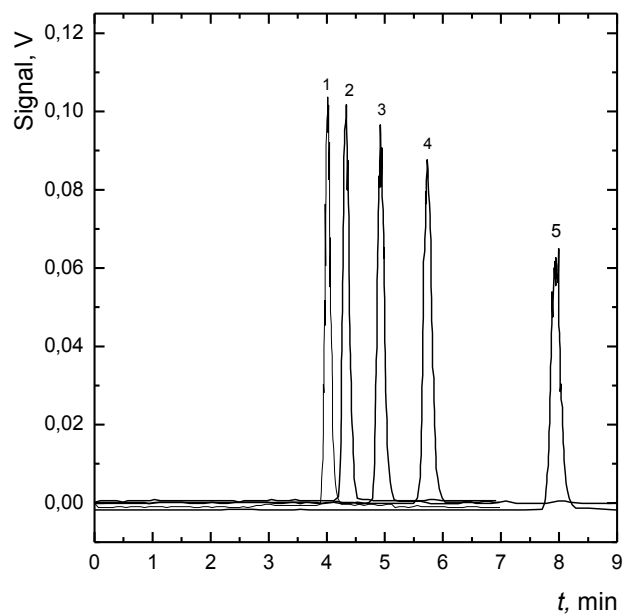
Ke studiu vlivu substituentů na retenční chování vybraných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu byla použita metoda kapalinové chromatografie na obrácených fázích C-18. Retenční časy studovaných látek byly naměřeny s použitím mobilní fáze acetonitril-voda s proměnlivým složením acetonitrilu  $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80; 0,75; 0,70; 0,65$  a  $0,60$ . Bylo zjištěno, že s poklesem obsahu organické složky v mobilní fázi dochází k prodlužování retenčního času. Tento trend je demonstrován na obr. 3.8 na příkladu derivátu **1**.

Z naměřených retenčních časů (tab. 3.2) byly vypočítány retenční faktory při daném složení mobilní fáze, ze kterých byly následně podle vztahu

$$\log k = \log k_0 - S\varphi \quad (3.1)$$

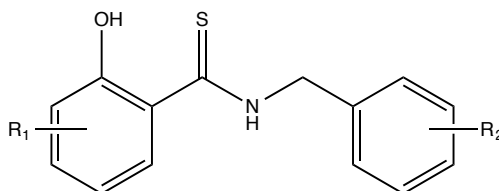
získány extrapolací retenční faktory  $k_0$  pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu a směrnice  $-S$  závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku  $\varphi$  acetonitrilu v mobilní fázi.





**Obr. 3.8** Vliv složení mobilní fáze na retenční čas *N*-benzyl-2-hydroxy-thiobenzamidu (derivát **1**), při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), mobilní fáze acetonitril-voda: (1)  $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80$ , (2)  $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,75$ , (3)  $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$ , (4)  $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,65$ , (5)  $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,60$ . ( $c(\text{derivátu}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $\lambda = 235 \text{ nm}$ , nástřik 10  $\mu\text{l}$ ).

**Tab. 3.2** Struktury, retenční časy, retenční faktory, extrapolované retenční faktory pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu, směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi, koeficient determinace závislosti  $\log k$  vs.  $\varphi$ , pro studované deriváty *N*-benzylsalicylthioamidu při HPLC chromatografii na koloně RP C-18 ZORBAX (250 × 4,6 mm, 5 μm) v mobilní fázi acetonitril-voda. ( $c(\text{derivát}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $l = 235 \text{ nm}$ ,  $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,60) = 150 \text{ s}$ ,  $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,65) = 129 \text{ s}$ ,  $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70) = 141 \text{ s}$ ,  $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,75) = 136 \text{ s}$ ,  $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80) = 137 \text{ s}$ , nástřik 10 μl).



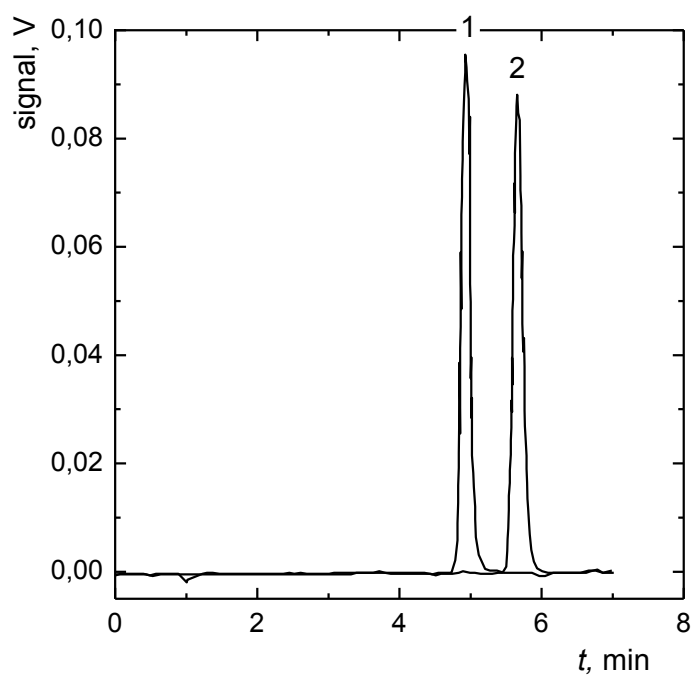
derivát	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	w(CH <sub>3</sub> CN)										log <i>k</i> <sub>0</sub>	− <i>S</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>
			0,60		0,65		0,70		0,75		0,80				
			<i>t</i> <sub>r</sub> , s	<i>k</i>	<i>t</i> <sub>r</sub> , s	<i>k</i>	<i>t</i> <sub>r</sub> , s	<i>k</i>	<i>t</i> <sub>r</sub> , s	<i>k</i>	<i>t</i> <sub>r</sub> , s	<i>k</i>			
<b>1</b>	-H	-H	476	2,17	344	1,67	293	1,07	260	0,91	241	0,76	1,728	0,024	0,9670
<b>2</b>	-H	3-CH <sub>3</sub>	618	3,11	414	2,21	342	1,42	293	1,16	262	0,92	2,081	0,027	0,9783
<b>3</b>	-H	3-Cl	642	3,27	417	2,24	341	1,41	292	1,15	259	0,90	2,181	0,028	0,9763
<b>4</b>	-H	4-CH <sub>3</sub>	635	3,22	426	2,31	348	1,46	297	1,19	267	0,95	2,103	0,027	0,9760
<b>5</b>	-H	4-Cl	662	3,41	427	2,31	346	1,45	298	1,19	266	0,94	2,186	0,028	0,9717
<b>6</b>	-H	4-F	506	2,37	354	1,75	296	1,09	264	0,94	240	0,76	1,865	0,025	0,9659
<b>7</b>	-H	4-OCH <sub>3</sub>	480	2,20	350	1,72	289	1,04 <sup>a</sup>	264	0,94	240	0,75	1,776	0,024	0,9975
<b>8</b>	-H	4- <i>terc</i> -butyl	1224	7,15	744	4,77	547	2,87	441	2,24	354	1,59	2,795	0,033	0,9872
<b>9</b>	-H	3,4-Cl <sub>2</sub>	823	4,48	513	2,98	399	1,82	338	1,49	293	1,15	2,404	0,030	0,9734
<b>10</b>	4-OCH <sub>3</sub>	-H	517	2,44	339	1,63	284	1,01 <sup>a</sup>	256	0,89	238	0,74	1,924	0,026	0,9864
<b>11</b>	5-Cl	-H	427	1,84	284	1,20	233	0,65 <sup>a</sup>	218	0,60	207	0,52	1,919	0,028	0,9809
<b>12</b>	4-CH <sub>3</sub>	-H	600	2,99	442	2,42	349	1,47	299	1,20	266	0,95	2,045	0,026	0,9749
<b>13</b>	5-Br	3-Br	540	2,60	337	1,61	261	0,85 <sup>a</sup>	232	0,71	213	0,56	2,422	0,034	0,9899
<b>14</b>	4-OCH <sub>3</sub>	3-Cl	636	3,23	430	2,33	327	1,31 <sup>a</sup>	281	1,07	253	0,85	2,311	0,030	0,9943
<b>15</b>	4-CH <sub>3</sub>	3-NO <sub>2</sub>	538	2,58	397	2,08	311	1,20 <sup>a</sup>	269	0,98	242	0,77	2,079	0,028	0,9913
<b>16</b>	4-Cl	4-Br	418	1,78	430	2,33 <sup>a</sup>	211	0,49 <sup>a</sup>	202	0,49	186	0,36	2,365	0,035	0,9961
<b>17</b>	5-Br	4-Br	556	2,70	554	3,29 <sup>a</sup>	251	0,78 <sup>a</sup>	236	0,74	208	0,52	2,595	0,036	0,9983
<b>18</b>	3-CH <sub>3</sub>	4-Cl	1119	6,45	778	5,04	533	2,77	419	2,09	342	1,50	2,798	0,033	0,9821
<b>19</b>	5-Cl	4-F	408	1,72	436	2,38 <sup>a</sup>	221	0,57 <sup>a</sup>	210	0,55	192	0,40	2,148	0,032	0,9984
<b>20</b>	4-CH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub>	785	4,22	577	3,47	418	1,96	345	1,54	293	1,15	2,420	0,030	0,9757
<b>21</b>	5-NO <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub>	154	0,03 <sup>a</sup>	145	0,12	142	0,00 <sup>a</sup>	141	0,04	139	0,01	3,108	0,615	0,9738
<b>22</b>	5-Cl	3,4-Cl <sub>2</sub>	623	3,15	624	3,84 <sup>a</sup>	274	0,94 <sup>a</sup>	248	0,82	212	0,55	2,774	0,038	0,9994
<b>23</b>	5-Br	3,4-Cl <sub>2</sub>	646	3,30	685	4,31 <sup>a</sup>	277	0,96	241	0,77	209	0,53	2,854	0,040	0,9639
<b>24</b>	4-CH <sub>3</sub>	4- <i>terc</i> -butyl	1613	9,74	1081	7,38	733	4,18	532	2,92	407	1,97	3,153	0,036	0,9915
<b>25</b>	5-OCH <sub>3</sub>	3-NO <sub>2</sub>	606	3,03	377	1,92	311	1,20	271	1,00	242	0,77	2,211	0,030	0,9663

<sup>a</sup> Hodnota vyloučena ze závislosti  $\log k$  vs.  $\varphi$  pro extrapolaci  $\log k_0$  a parametr  $-S$ .

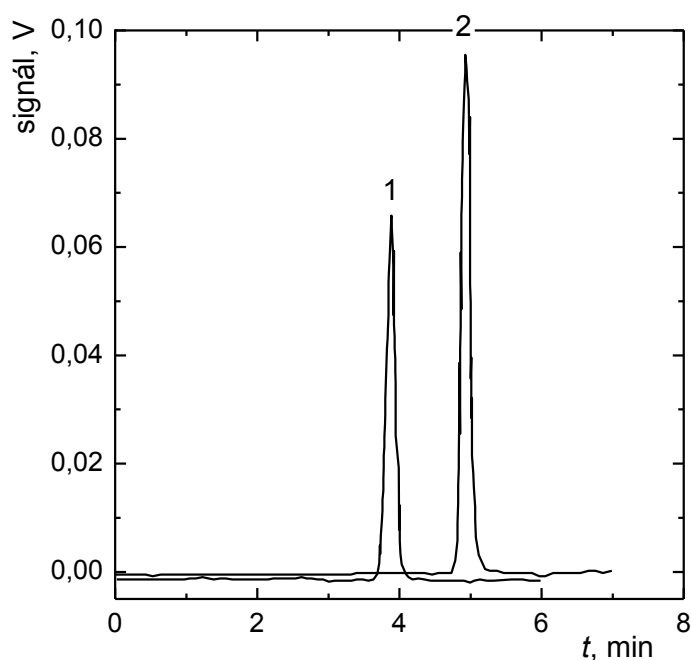
### 3.3 Regresní vztahy mezi retenčními faktory a deskriptory studovaných látek

Z naměřených dat je patrné, že retenční časy jsou ovlivňovány substituenty na obou substitučních místech *N*-benzylsalicylthioamidu. Na obr. 3.9 je demonstrován vliv substituentů na retenční čas pro deriváty substituované jen na amidovém kruhu, na obr. 3.10 pro deriváty se substitucí pouze na acylovém kruhu a na obr. 3.11 pro deriváty se substitucí na obou kruzích.

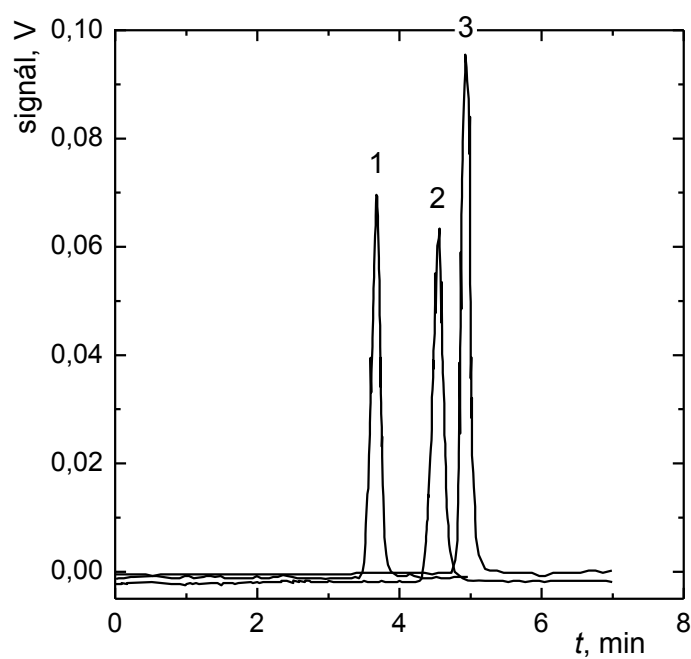
Kvantifikace vlivu struktury na retenční chování studovaných derivátů, charakterizovaného pomocí retenčního faktoru  $k_0$  pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu a směrnice  $-S$  závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi, byla provedena se dvěma deskriptory (a) s rozdělovacím koeficientem oktanol-voda, (b) se substituentovými konstantami hydrofobicity. V tab. 3.3 je uveden přehled použitých deskriptorů a veličin popisujících retenční chování studovaných *N*-benzylsalicylthioamidů.



**Obr. 3.9** Vliv substituentů na retenční čas studovaných *N*-benzylsalicylthioamidů při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (250 × 4,6 mm) v mobilní fázi acetonitril-voda 70:30; (1) *N*-benzyl-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **1**), (2) *N*-(3-methylbenzyl)-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **2**) ( $c(\text{derivátu}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $\lambda = 235 \text{ nm}$ , nástřik 10  $\mu\text{l}$ ).

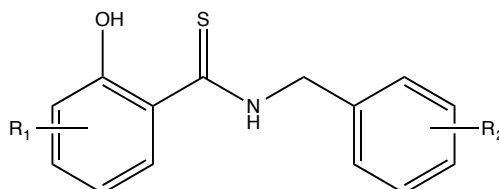


**Obr. 3.10** Vliv substituentů na retenční čas studovaných *N*-benzylsalicylthioamidů při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (250 × 4,6 mm) v mobilní fázi acetonitril-voda 70:30; (1) *N*-benzyl-2-hydroxy-5-chlor-thiobenzamid (derivát **11**), (2) *N*-benzyl-2-hydroxy-thiobenzamidu (derivát **1**). ( $c(\text{derivátu}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $\lambda = 235 \text{ nm}$ , nástřik 10  $\mu\text{l}$ ).



**Obr. 3.11** Vliv substituentů na retenční čas studovaných *N*-benzylsalicylthioamidů při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (250 × 4,6 mm) v mobilní fázi acetonitril-voda 70:30; (1) *N*-(4-fluorbenzyl)-5-chlor-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **19**), (2) *N*-(3,4-dichlorbenzyl)-5-brom-2-hydroxy-thiobenzamid (derivát **22**), (3) *N*-benzyl-2-hydroxy-thiobenzamidu (derivát **1**). ( $c(\text{derivátu}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $\lambda = 235 \text{ nm}$ , nástřik  $10 \mu\text{l}$ ).

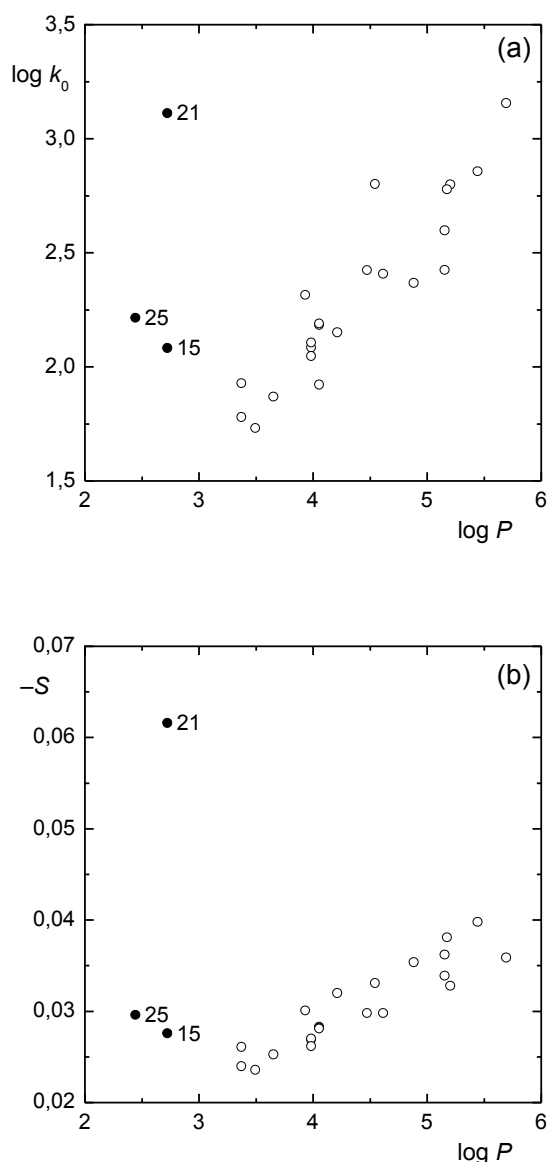
**Tab. 3.3** Struktury, hydrofobní substituentové konstanty, logaritmy rozdělovacího koeficientu oktanol-voda, extrapolované retenční faktory pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu a směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi pro studované deriváty *N*-benzylsalicylthioamidu při HPLC chromatografii na koloně RP C-18 ZORBAX (250 × 4,6 mm) v mobilní fázi acetonitril-voda. ( $c(\text{derivát}) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ,  $l = 235 \text{ nm}$ , nástřik 10  $\mu\text{l}$ ).



derivát	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$\pi_{R1}$	$\pi_{R2}$	$\log P$	$\log k_0$	$-S$
1	-H	-H	0,00	0,00	3,50	1,728	0,024
2	-H	3-CH <sub>3</sub>	0,00	0,56	3,99	2,081	0,027
3	-H	3-Cl	0,00	0,71	4,06	2,181	0,028
4	-H	4-CH <sub>3</sub>	0,00	0,56	3,99	2,103	0,027
5	-H	4-Cl	0,00	0,71	4,06	2,186	0,028
6	-H	4-F	0,00	0,14	3,66	1,865	0,025
7	-H	4-OCH <sub>3</sub>	0,00	-0,02	3,38	1,776	0,024
8	-H	4- <i>terc</i> -butyl	0,00	1,98	5,21	2,795	0,033
9	-H	3,4-Cl <sub>2</sub>	0,00	1,42	4,62	2,404	0,030
10	4-OCH <sub>3</sub>	-H	-0,02	0,00	3,38	1,924	0,026
11	5-Cl	-H	0,71	0,00	4,06	1,919	0,028
12	4-CH <sub>3</sub>	-H	0,56	0,00	3,99	2,045	0,026
13	5-Br	3-Br	0,86	0,86	5,16	2,422	0,034
14	4-OCH <sub>3</sub>	3-Cl	-0,02	0,71	3,94	2,311	0,030
15	4-CH <sub>3</sub>	3-NO <sub>2</sub>	0,56	-0,28	2,73	2,079	0,028
16	4-Cl	4-Br	0,71	0,86	4,89	2,365	0,035
17	5-Br	4-Br	0,86	0,86	5,16	2,595	0,036
18	3-CH <sub>3</sub>	4-Cl	0,56	0,71	4,55	2,798	0,033
19	5-Cl	4-F	0,71	0,14	4,22	2,148	0,032
20	4-CH <sub>3</sub>	4-CH <sub>3</sub>	0,56	0,56	4,48	2,420	0,030
21	5-NO <sub>2</sub>	4-CH <sub>3</sub>	-0,28	0,56	2,73	3,108	0,615
22	5-Cl	3,4-Cl <sub>2</sub>	0,71	1,42	5,18	2,774	0,038
23	5-Br	3,4-Cl <sub>2</sub>	0,86	1,42	5,45	2,854	0,040
24	4-CH <sub>3</sub>	4- <i>terc</i> -butyl	0,56	1,98	5,70	3,153	0,036
25	5-OCH <sub>3</sub>	3-NO <sub>2</sub>	-0,02	-0,28	2,45	2,211	0,030

### 3.3.1 QSRR s rozdělovacím koeficientem oktanol-voda

Vynesením závislosti  $\log k_0$ , resp.  $-S$ , studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidů na hodnotě rozdělovacího koeficientu oktanol-voda (obr. 3.12) bylo zjištěno, že ze závislosti se výrazně vydělují deriváty obsahující ve své struktuře nitroskupinu, tedy **15**, **21** a **25**.



**Obr. 3.12** Korelace mezi (a) hodnotami logaritmu retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu a hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol-voda, (b) směrnici závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi a hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol-voda při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX pro studované *N*-benzylsalicylthioamidy: (○) deriváty neobsahující nitroskupinu, (●) deriváty obsahující nitroskupinu v molekule derivátu.

Pravděpodobnou příčinou tohoto jevu je, že se při chromatografické interakci mezi látkou a stacionární fází u derivátů s nitroskupinou uplatňují jiné efekty než u ostatních studovaných derivátů. Proto byly tyto deriváty (tedy deriváty **15**, **21** a **25**) z dalších korelačních výpočtů vyloučeny. Pro další výpočty bylo dále pracováno pouze s daty ostatních studovaných derivátů. Byly získány výsledné rovnice popisující korelaci logaritmu retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu, resp. směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi, s logaritmem rozdělovacího koeficientu oktanol-voda

$$\log k_0 = 0,514 (\pm 0,050) \log P + 0,05 (\pm 0,22) \quad (3.2)$$

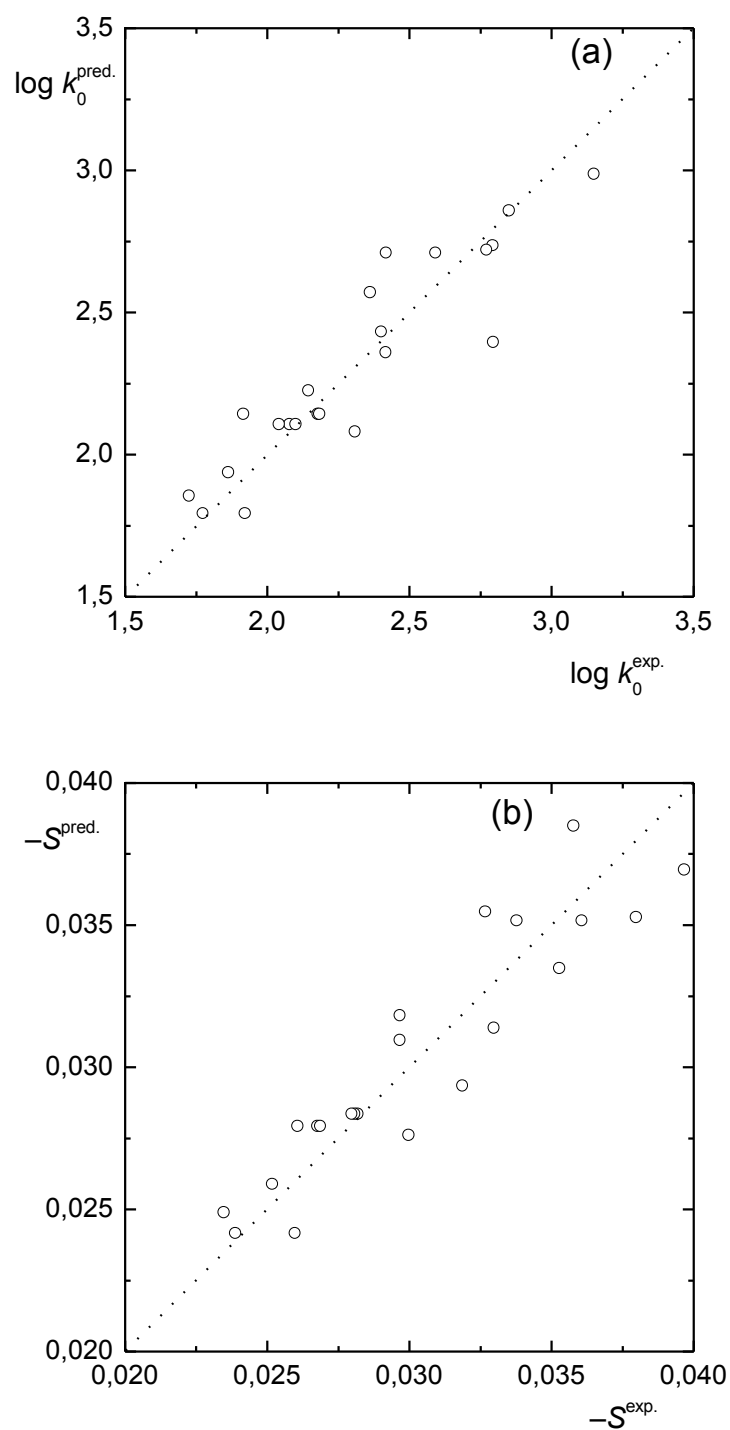
$$n = 22, r^2 = 0,8435, s_y = 0,16, F = 107,79 > F_{2, 22, 0,05} = 3,44$$

$$-S = 0,00618 (\pm 0,00058) \log P + 0,0032 (\pm 0,0026) \quad (3.3)$$

$$n = 22, r^2 = 0,8487, s_y = 0,0019, F = 112,20 > F_{2, 22, 0,05} = 3,44$$

Statistické parametry obou korelačních rovnic ukazují, že rovnice jsou statisticky platné. Grafické vyjádření nalezených korelačních rovnic (3.2) a (3.3) je uvedeno na obr. 3.13.





**Obr. 3.13** Korelace (a) mezi hodnotami logaritmu experimentálně zjištěného retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu a hodnotami predikovanými z korelační rovnice (3.2), (b) mezi hodnotami experimentálně zjištěné směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi a hodnotami predikovanými z korelační rovnice (3.3) studované *N*-benzylsalicylthioamidy. Tečkovaná čára znázorňuje ideální korelaci s  $r^2 = 1,0000$ .

### 3.3.2 QSRR s hydrofobními substituentovými $\pi$ konstantami

Druhou možností, jak kvantifikovat vliv substituentů na chromatografické chování studovaných derivátů, bylo použití hydrofobních substituentových  $\pi$  konstant pro substituenty na obou substitučních místech. Proto byla formulována obecná regresní rovnice

$$\text{retenční parametr} = a \pi_{R1} + b \pi_{R2} + c \quad (3.4)$$

kde *retenční parametr* je buď logaritmus retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu nebo směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi,  $a$ ,  $b$ ,  $c$  jsou regresní parametry a  $\pi_{R1}$ ,  $\pi_{R2}$  pak hydrofobní substituentové konstanty na acylovém, resp. amidovém, kruhu.

K ověření statistické platnosti příslušných rovnic byla dostupná data (tj. data všech studovaných derivátů, s vyloučením derivátů obsahujících ve struktuře nitroskupinu) rozdělena na trénovací a validační sadu. Byla testována celkem čtyři různá rozdělení derivátů, s cílem dosáhnout maximální distribuce retenčních parametrů, resp. hydrofobních konstant, v obou sadách. V každém rozdělení byly deriváty seřazeny ve vzestupné řadě podle zvoleného parametru, liché členy řady byly zahrnuty do trénovací sady, sudé členy řady pak do sady validační. Přehled vytvořených rozdělení a sad udává tab. 3.4.

**Tab. 3.4** Použitá rozdělení pro testování QSRR rovnic s hydrofobními substituentovými konstantami, podmínky třídění příslušného rozdělení a deriváty zahrnuté do testovací a validační sady

rozdělení	podmínka třídění	sada	deriváty
I	$\log k_0$	trénovací	1, 2, 5, 6, 8, 10, 16, 17, 19, 20, 23
		validační	3, 4, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 18, 22, 24
II	$\pi_{R1}$	trénovací	1, 3, 5, 7, 9, 10, 16, 17, 18, 22, 24
		validační	2, 4, 6, 8, 11, 12, 13, 14, 19, 20, 23
III	$\pi_{R2}$	trénovací	3, 4, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 17, 19, 22
		validační	1, 2, 5, 6, 9, 11, 16, 18, 20, 23, 24
IV	$-S$	trénovací	1, 4, 5, 6, 8, 12, 13, 14, 20, 22, 24
		validační	2, 3, 7, 9, 10, 11, 16, 17, 18, 19, 23

Pomocí trénovacích sad rozdělení I.–III. byly vypočítány regresní rovnice pro logaritmus retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu

a) z rozdělení I:

$$\log k_0 = 0,488 (\pm 0,044) \pi_{R1} + 0,369 (\pm 0,069) \pi_{R2} + 1,825 (\pm 0,041) \quad (3.5)$$

$$n = 11, r^2 = 0,9590, s_y = 0,084, F = 93,60 > F_{3, 11, 0,05} = 3,59$$

b) z rozdělení II:

$$\log k_0 = 0,477 (\pm 0,097) \pi_{R1} + 0,48 (\pm 0,17) \pi_{R2} + 1,830 (\pm 0,084) \quad (3.6)$$

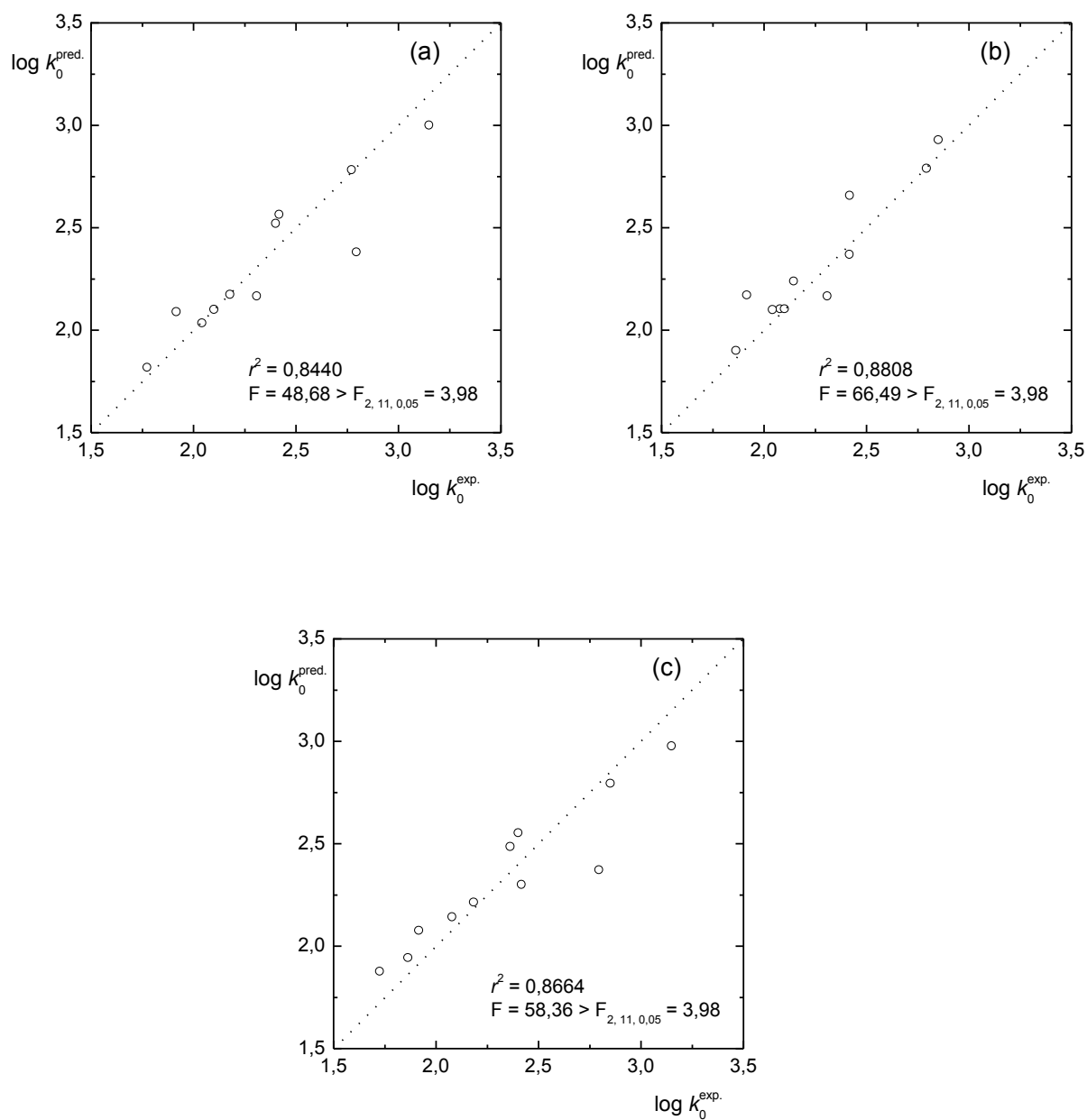
$$n = 11, r^2 = 0,8863, s_y = 0,17, F = 31,19 > F_{3, 11, 0,05} = 3,59$$

c) z rozdělení III:

$$\log k_0 = 0,476 (\pm 0,036) \pi_{R1} + 0,281 (\pm 0,058) \pi_{R2} + 1,873 (\pm 0,036) \quad (3.7)$$

$$n = 11, r^2 = 0,9633, s_y = 0,072, F = 105,07 > F_{3, 11, 0,05} = 3,59$$

Správnost regresních rovnic (3.5)–(3.7) byla testována pomocí odpovídajících validačních sad, na obr. 3.14 je znázorněna korelace mezi experimentálně zjištěnými hodnotami logaritmu retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu a hodnotami predikovanými z příslušné regresní rovnice.



**Obr. 3.14** Korelace mezi experimentálně zjištěnými hodnotami logaritmu retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu validační sady příslušného rozdělení a hodnotami predikovanými (a) z regresní rovnice (3.5), (b) z regresní rovnice (3.6), (c) z regresní rovnice (3.7). Tečkovaná čára znázorňuje ideální korelaci s  $r^2 = 1,0000$ .

Ze statistických parametrů korelací uvedených na obr. 3.14 plyne, že testovaný přístup k vytvoření regresní rovnice je správný a všechna tři použítá rozdělení poskytují platné QSRR regrese. Proto byla s použitím dat pro všechny studované deriváty vypočítána výsledná rovnice pro logaritmus retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu

$$\log k_0 = 0,518 (\pm 0,047) \pi_{R1} + 0,355 (\pm 0,079) \pi_{R2} + 1,822 (\pm 0,048) \quad (3.8)$$

$$n = 22, r^2 = 0,8951, s_y = 0,13, F = 81,10 > F_{3, 22, 0,05} = 3,05$$

Z této rovnice je patrné, že na hodnotu logaritmu retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu má větší vliv substituent na acylovém kruhu, tedy substituent R<sup>1</sup>.

Dále byly pomocí trénovacích sad rozdělení II.–IV. vypočítány regresní rovnice pro směrnici závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi

a) z rozdělení II:

$$-S = 0,00334 (\pm 0,00063) \pi_{R1} + 0,0010 (\pm 0,0011) \pi_{R2} + 0,02500 (\pm 0,00054) \quad (3.9)$$

$$n = 11, r^2 = 0,9645, s_y = 0,0011, F = 108,61 > F_{3, 11, 0,05} = 3,59$$

b) rozdělení III:

$$-S = 0,00473 (\pm 0,00084) \pi_{R1} + 0,0072 (\pm 0,0013) \pi_{R2} + 0,02482 (\pm 0,00085) \quad (3.10)$$

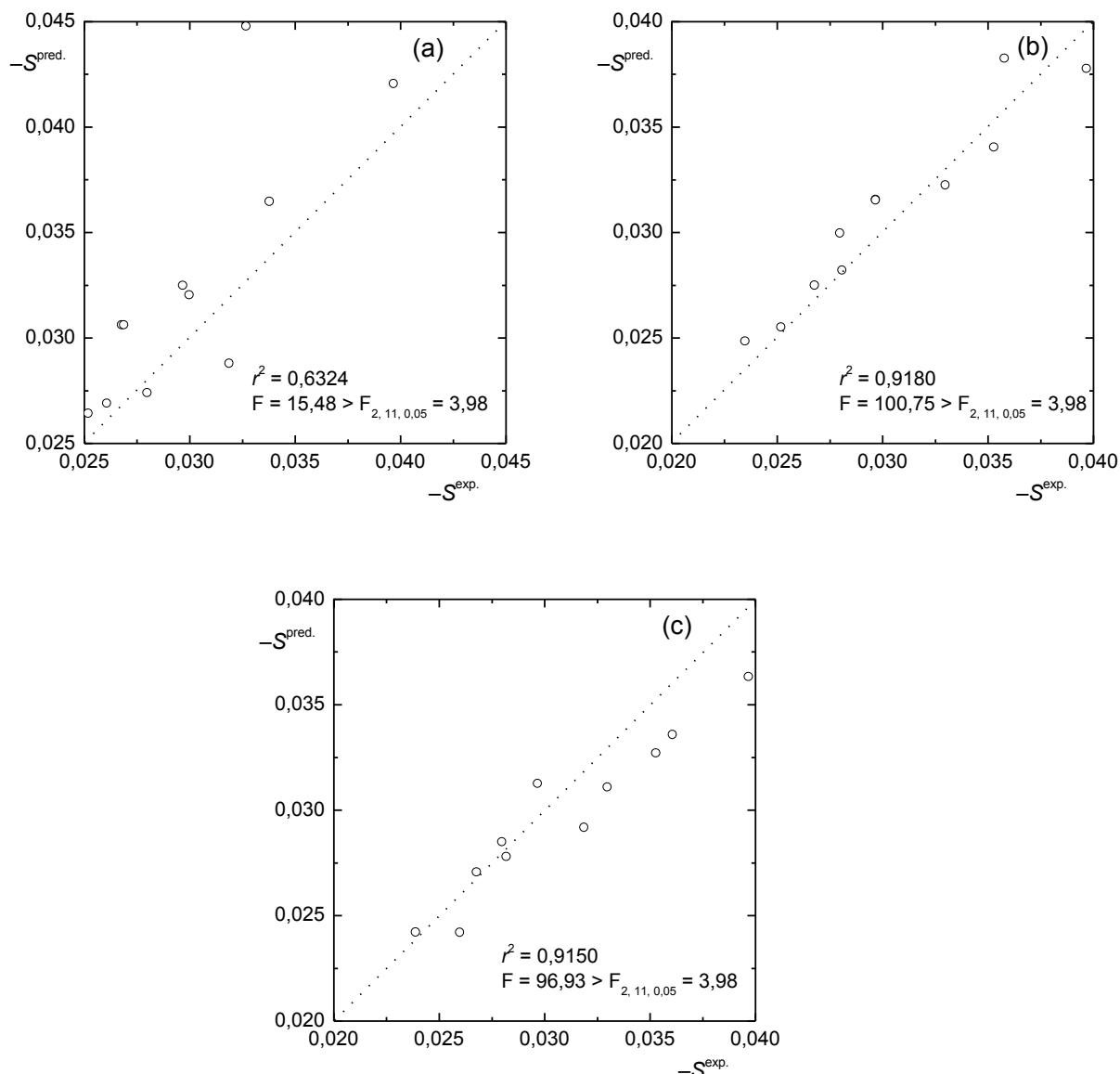
$$n = 11, r^2 = 0,8906, s_y = 0,0017, F = 32,56 > F_{3, 11, 0,05} = 3,59$$

c) rozdělení IV:

$$-S = 0,00489 (\pm 0,00071) \pi_{R1} + 0,0059 (\pm 0,0014) \pi_{R2} + 0,02429 (\pm 0,00079) \quad (3.11)$$

$$n = 11, r^2 = 0,9086, s_y = 0,0016, F = 39,77 > F_{3, 11, 0,05} = 3,59$$

Správnost regresních rovnic (3.9)–(3.11) byla testována pomocí odpovídajících validačních sad, na obr. 3.15 je znázorněna korelace mezi experimentálně zjištěnými hodnotami směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi a hodnotami predikovanými z příslušné regresní rovnice.



**Obr. 3.15** Korelace mezi experimentálně zjištěnými hodnotami experimentálně zjištěnými hodnotami směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi validační sady příslušného rozdělení a hodnotami predikovanými (a) z regresní rovnice (3.9), (b) z regresní rovnice (3.10), (c) z regresní rovnice (3.11). Tečkovaná čára znázorňuje ideální korelaci s  $r^2 = 1,0000$ .

Ze statistických parametrů korelací uvedených na obr. 3.15 plyne, že testovaný přístup k vytvoření regresní rovnice je správný a všechna tři použitá rozdělení poskytují platné QSRR regrese. Proto byla s použitím dat pro všechny studované deriváty vypočítána výsledná rovnice pro směrnici závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi

$$-S = 0,00467 (\pm 0,00055) \pi_{R1} + 0,00775 (\pm 0,00092) \pi_{R2} + 0,0244 (\pm 0,00056) \quad (3.12)$$

$$n = 22, r^2 = 0,9013, s_y = 0,0015, F = 86,74 > F_{3, 22, 0,05} = 3,05$$

Z této rovnice je patrné, že na hodnotu směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi má větší vliv substituent na amidovém kruhu, tedy substituent  $R^2$ .

## 4 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zaměřila na studium molekulových absorpčních spekter derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu v UV oblasti a na QSRR studium chromatografických vlastností těchto látek.

V první části práce byla naměřena molekulová absorpční spektra studovaných látek v UV oblasti. Ze spekter bylo zjištěno, že všechny studované deriváty vykazují v ultrafialové oblasti dvě absorpční maxima při vlnových délkách okolo 260 nm a 293 nm. Jelikož se u studovaných látek objevují dvě strukturní obměny, bylo možno vliv substituentů na molekulová absorpční spektra v ultrafialové oblasti charakterizovat pouze kvalitativně. Sestrojením kalibrační závislosti absorpce na koncentraci derivátu **1** se dokázalo, že koncentrace látky neovlivňuje průběh absorpčního spektra. Bylo zjištěno, že substituce auxochromním substituentem (např.  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{X}$ ) na acylovém kruhu vede ke zvýšení hodnoty molárního absorpčního koeficientu (hyperchromní efekt) zejména prvního absorpčního maxima a k posunu absorpčního pásu k vyšším vlnovým délkám (bathochromní efekt). Přítomnost auxochromů na amidovém kruhu, s výjimkou nepolárních alifatických substituentů, vede rovněž k hyperchromnímu efektu.

V druhé části práce byly pomocí HPLC chromatografie na koloně s obrácenou fází XDB-C18 ZORBAX v mobilní fázi acetonitril-voda s proměnlivým složením acetonitrilu  $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80; 0,75; 0,70; 0,65$  a  $0,60$  naměřeny retenční časy studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu. Bylo zjištěno, že s poklesem obsahu organické složky v mobilní fázi dochází k prodlužování retenčního času.

Z naměřených retenčních časů byly vypočítány příslušné retenční faktory. Ke kvantifikaci vlivu struktury na retenční chování studovaných látek, charakterizovaného pomocí retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu a směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi, byly použity dva strukturní deskriptory, a to rozdělovací koeficient oktanol-voda a substituentové konstanty hydrofobicity. Bylo zjištěno, že deriváty obsahující nitroskupinu, tedy **15**, **21** a **25**, se svým retenčním chováním vydělují



ze studovaného souboru derivátů. Pravděpodobnou příčinou tohoto jevu je objemnost a vysoká polarita substituentu, která způsobuje odlišnou chromatografickou interakci mezi látkou a stacionární fází. Po vyloučení derivátů **15**, **21** a **25** ze studovaného souboru látek byly získány výsledné rovnice popisující korelaci logaritmu retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu, resp. směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi, s logaritmem rozdělovacího koeficientu oktanol-voda

$$\log k_0 = 0,514 (\pm 0,050) \log P + 0,05 (\pm 0,22) \quad (3.2)$$

$$n = 22, r^2 = 0,8435, s_y = 0,16, F = 107,79 > F_{2, 22, 0,05} = 3,44$$

$$-S = 0,00618 (\pm 0,00058) \log P + 0,0032 (\pm 0,0026) \quad (3.3)$$

$$n = 22, r^2 = 0,8487, s_y = 0,0019, F = 112,20 > F_{2, 22, 0,05} = 3,44$$

Ze statistických parametrů obou korelačních rovnic lze usuzovat, že jsou statisticky správné.

Druhou možností, jak kvantifikovat vliv substituentů na chromatografické chování studovaných derivátů, bylo použití hydrofobních substituentových konstant. K ověření statistické správnosti korelačních rovnic byla dostupná data rozdělena na trénovací a validační sadu. Byla testována celkem čtyři různá rozdělení derivátů. Po ověření statistické platnosti testovací sady pro tři rozdělení byla nalezena výsledná korelační rovnice pro logaritmus retenčního faktoru s nulovým obsahem acetonitrilu

$$\log k_0 = 0,518 (\pm 0,047) \pi_{R1} + 0,355 (\pm 0,079) \pi_{R2} + 1,822 (\pm 0,048) \quad (3.8)$$

$$n = 22, r^2 = 0,8951, s_y = 0,13, F = 81,10 > F_{3, 22, 0,05} = 3,05$$

Korelační rovnice se ukázala jako statisticky platná a z hodnot korelačních koeficientů je patrné, že na hodnotu logaritmu retenčního faktoru pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu má větší vliv substituent na acylovém kruhu. Podobně byla vypočítána i regresní rovnice pro směrnici závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi

$$-S = 0,00467 (\pm 0,00055) \pi_{R1} + 0,00775 (\pm 0,00092) \pi_{R2} + 0,0244 (\pm 0,00056) \quad (3.12)$$

$$n = 22, r^2 = 0,9013, s_y = 0,0015, F = 86,74 > F_{3, 22, 0,05} = 3,05$$

Z porovnání hodnot regresních koeficientů je patrné, že na hodnotu směrnice závislosti logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku acetonitrilu v mobilní fázi má větší vliv substituent na amidovém kruhu.

## 5 Literatura

- [1] Giaginis, C.; Tsantili-Kakoulidou, A.: Quantitative Structure-Retention Relationships as Useful Tool to Characterize Chromatographic Systems and Their Potential to Simulate Biological Processes. *Chromatographia* **76**, 211 – 226 (2013).
- [2] Kaliszan, R.; QSRR: Quantitative Structure–(Chromatographic) Retention Relationships. *Chemical Review* **107**, 3212 – 3246 (2007).
- [3] Kaliszan, R.: Chromatography in Studies of Quantitative Structure–Activity Relationships. *Journal of Chromatography A* **220**, 71 – 83 (1981).
- [4] Kaliszan, R.: Quantitative Structure-Retention Relationships. *Analytical Chemistry* **64**, 619A – 631A (1992).
- [5] Kaliszan, R.: *Structure and Retention in Chromatography: A Chemometric Approach*. Amsterdam, Hardwood Academic Publishers 1997.
- [6] Kaliszan, R.: Recent Advances in Quantitative Structure-Retention Relationships (QSRR). In: *Handbook of Analytical Separations Vol 1*. Smith, R. (ed.) Elsevier, p. 503 – 534 (2000).
- [7] Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman D.: *Exploring QSAR*. Washington, American Chemical Society 1995.
- [8] Héberger, K.: Quantitative Structure–(Chromatographic) Retention Relationships. *Journal of Chromatography A* **1158**, 273 – 305 (2007).
- [9] Todeschini R.; Consonni V.: *Handbook of Molecular Descriptors*. Weinheim, Wiley 2007.
- [10] Graham P.: *An Introduction to Medicinal Chemistry*. New York, Oxford University Press Inc. 2009.
- [11] Hermens J.; de Bruijn J.; Brooke D.: The Octanol–Water Partition Coefficient: Strengths and Limitations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **32**:4, 732 – 733 (2013).

- [12] Mannhold R.; van de Waterbeemd H.: Substructure and Whole Molecule Approaches for Calculating log P. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **15**, 337 – 354 (2001).
- [13] Steinfeld, J.: *Molecules and Radiation: An Introduction to Modern Molecular Spectroscopy, Edition 2*. New York, Dover Publications 2005.
- [14] McMurry, J.: *Funfamentals of Organic Chemistry, Edition 5*. Pacific Grove, Brooks/Cole 2002.
- [15] Valentic, N.; Mijin,D.;Uscumlic, G.; Marinkovic, A.; Petrovic, S.: Solvent and Substituent Effect on Electronic Spektra of N-(4-substituted phenyl)-2,3-diphenylpropanamides. *Arkivoc* **12**, 81 – 90 (2006).
- [16] Gulseven Sidir, Y.; Sidir, I.; Berber, H.; Tasal, E.: An Experimental Study of Relationship between Hammet Substituent Constant and Electronic Absorption Wavelength of Some Azo Dyes. *Journal of Science and Technology* **1**, 7 – 11 (2011).
- [17] Russell, D.: Mycobacterium Tuberculosis: Here Today, and Here Tomorrow. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* **2**, 569 – 577 (2001).
- [18] Lawn, S.; Zumla, A.: Tuberculosis. *Lancet* **378**, 57 – 72 (2011).
- [19] Global Tuberculosis Report 2014, World Health Organization, <<http://www.who.int/>> (cit. 18. 3. 2014).
- [20] <[http://www.uzis.cz/rychle-informace/vyskyt-tuberkulozy-ceske-republice-roce-2013#\\_ftn1](http://www.uzis.cz/rychle-informace/vyskyt-tuberkulozy-ceske-republice-roce-2013#_ftn1)> (cit. 18. 3. 2014)
- [21] Rahama, O.; Thaker, H.: Atypical Mycobacteria: An Important Differential for the General Physician. *Clinical Medicine* **13**:5, 504 – 506 (2013).
- [22] Melichar, B. A kol.: *Chemická léčiva*. 3. vydání, Praha, Avicenum 1987.
- [23] Hynie, S.: *Speciální farmakologie*. 1. Vydání, Praha, Karolinum 1999.
- [24] Horsburgh, C.: Tuberculosis. *European Respiratory Review* **23**, 36 – 39 (2014).
- [25] Matyk, J.; Waisser, K.; Dražková, K.; Kuneš, J.; Klimešová, V.; Palát, K. Jr.; Kaustová, J.: Heterocyclic Isomers of Antimycobacterial salicylanilides. *Farmaco* **60**, 399 – 408 (2005).
- [26] Petrlíková, E.; Waisser, K.; Buchta, V.; Jílek, P.; Vejsová, M.: N-Benzylsalicylthioamides as Novel Compounds with Promising Antimycotic Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20**, 4535 – 4538 (2010).
- [27] Waisser, K.; Peřina, M.; Klimešová, V.; Kaustová, J.: On the Relationship between the Structure and Antimycobacterial Activity of Substituted

- N*-benzylsalicylthioamides. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **68**, 1275 – 1294 (2003).
- [28] Lullmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*. 5. Přepřac. Vydání. Praha, Grada 2007.
- [29] Waisser, K.; Petrliková, E.; Jílek, P.; Dufková, I.: Antibacterial activity of *N*-benzylsalicylthioamides. *Folia Microbiologica* **55**, 418 – 421 (2010).
- [30] Doležal, R.; Waisser, K.; Petrliková, E.; Kuneš, J.; Kubicová, L.; Macháček, M.; Kaustová, J.; Dahse, H. M.: *N*-benzylsalicylthioamides: Highly Active Potential Antituberculotics. *Archiv der Pharmazie* **342**, 113 – 119 (2009).
- [31] Miller, J. N.; Miller J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5<sup>th</sup> ed. Harlow, Pearson Education 2005.
- [32] Doerffel, K.; Eckschlager, K.: *Optimální postup chemické analýzy*. STNL, Praha 1985.
- [33] Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D.: *Exploring QSAR. Vol 2 – Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. Washington, American Chemical Society 1995.
- [34] Batjargal, S.; Wang, Y. J.; Goldberg, J. M.; Wissner, R. F.; Petersson, E. J.: Native Chemical Ligation of Thioamide-Containing Peptides: Development and Application to the Synthesis of Labeled  $\alpha$ -Synuclein for Misfolding Studies. *Journal of American Chemical Society* **132**:22, 9172 – 9182 (2002).